



**UNIVERSIDADE NOVA DE LISBOA**  
**INSTITUTO DE HIGIENE E MEDICINA TROPICAL**

**Efeito larvicida de extratos aquosos de resíduos de café, em  
três espécies de *Anopheles* (Diptera, Culicidae)**

Flávia Cristina Bento Ribeiro

DISSERTAÇÃO PARA A OBTENÇÃO DO GRAU DE MESTRE EM CIÊNCIAS  
BIOMÉDICAS

**Outubro 2015**



**UNIVERSIDADE NOVA DE LISBOA**  
**INSTITUTO DE HIGIENE E MEDICINA TROPICAL**

**Efeito larvicida de extratos aquosos de resíduos de café, em  
três espécies de *Anopheles* (Diptera, Culicidae)**

**Autora:** Flávia Cristina Bento Ribeiro

**Orientadora:** Professora Doutora Carla Sousa (IHMT)

**Co-orientadora:** Investigadora Pós-Doc. Doutora Carla Brazinha (LAVQ/Requimte - FCT-UNL)

Dissertação apresentada para cumprimento dos requisitos necessários à obtenção do grau de Mestre em Ciências Biomédicas

**Outubro 2015**

*“ A melhor maneira de prever o futuro é criá-lo ”*

*Dr. Forrest C. Shaklee*

## *Agradecimentos*

---

À minha orientadora Carla Sousa e co-orientadora Carla Brazinha, pela confiança depositada em mim neste projeto, pela disponibilidade, paciência, e acima de tudo pela amizade, ao longo de todo este período. Agradeço por todos os conhecimentos transmitidos e por me terem suscitado o interesse em duas áreas tão distintas.

Agradeço ao grupo LAVQ/Requimte – FCT-UNL, por me terem recebido e por terem tornado possível o desenvolvimento de grande parte deste trabalho.

À Mafalda Cadima e Rita Valério, por toda a paciência, ajuda, orientação inicial e pela integração no grupo de membranas.

Agradeço a todos os colegas do grupo de Entomologia Médica do IHMT, em particular à Bianca Pires, ao Gonçalo Alves e Gonçalo Seixas, por toda a amizade, ajuda e bons momentos.

Ao Dr. Vítor Várzea do CIFIC/IITC por ter disponibilizado a matéria-prima e pelos conhecimentos transmitidos na produção de cafeeiros.

Às minhas colegas de mestrado, pelo companheirismo e ajuda mútua no início desta caminhada, um especial agradecimento às colegas e amigas, Joana Monteiro, Sílvia Pereira, Cláudia Coroa e Mafalda Claro.

A todos os meus amigos, aos de sempre e aos que foram aparecendo ao longo da vida, agradeço toda a amizade e presença na minha vida. Um especial agradecimento ao Marcos por todo o companheirismo, por acreditar em mim e por cuidar de mim nesta última fase.

À minha irmã por tudo o que ela representa para mim e por toda a sua ajuda. Um enorme obrigado!

Ao meu irmão por todo o carinho, amizade e por me fazer sempre rir.

Aos meus pais, por todo o carinho e apoio incondicional desde sempre, que me ajudaram a atingir mais uma etapa importante. Agradeço todos os dias por estarem presentes na minha vida. E a quem eu dedico todo este trabalho.

A (re) emergência de doenças transmitidas por mosquitos, tais como as filarioses e as arboviroses (*e.g.* dengue), é atualmente, um dos maiores problemas de saúde a nível mundial, devido à elevada mortalidade e morbilidade que estas patologias causam, especialmente, em regiões tropicais e subtropicais, onde o acesso a sistemas de saúde é deficitário. O uso de inseticidas continua a ser uma das estratégias mais utilizada no controlo dos insetos vetores destas doenças, contudo, devido ao uso excessivo destes químicos, os níveis de resistência dos mosquitos aos inseticidas têm vindo a aumentar. Assim, é necessário pôr em prática novas estratégias para reduzir as populações de vetores de forma sustentável e economicamente viável, especialmente, em países em desenvolvimento.

Neste trabalho avaliou-se o efeito larvicida de extratos obtidos a partir de resíduos provenientes da indústria de café. Neste estudo recorreu-se a uma tecnologia de elevada sustentabilidade e inovadora na sua aplicação a esta problemática: a tecnologia de separação de componentes por membranas.

Com base nesta tecnologia foram obtidos de extratos enriquecidos em compostos fenólicos, particularmente, cafeína (CAF) e ácido clorogénico (CGA). Inicialmente, otimizou-se as condições extração (temperatura, o tempo de extração e meio de solvente). De seguida, avaliou-se os parâmetros de rejeição e valores de permeabilidade de diferentes membranas de ultrafiltração e nanofiltração na obtenção de frações enriquecidas dos compostos em estudo. E por fim, os extratos brutos e fracionados foram concentrados por evaporação a vácuo num rotavapor.

As concentrações obtidas para o extrato bruto concentrado foram de 2727, 763 e 797 mg.L<sup>-1</sup>, de fenólicos totais, CAF e CGA, respetivamente. Para o extrato fracionado após concentração foram encontrados valores de 2267, 730 e 553 mg.L<sup>-1</sup>, de fenólicos totais, CAF e CGA, respetivamente.

Com os extratos brutos e fracionados concentrados efetuaram-se bioensaios padronizados OMS de sensibilidade aos inseticidas em larvas de 3º/4º estado de *Anopheles gambiae* Gilles, 1972, *Anopheles stephensi* Liston, 1901 e *Anopheles atroparvus* Van Thiel, 1927, respetivamente, o principal vetor de malária em África e Ásia, e, o antigo vetor desta doença na Europa. As mortalidades ocorridas com o extrato bruto concentrado foram de 100% para *An. gambiae* e *An. stephensi* e de 96% para *An. atroparvus*. Com o extrato fracionado concentrado, as mortalidades foram de 99%, 95% e de 54% para *An. gambiae*, *An. stephensi* e *An. atroparvus*, respetivamente.

Foram ainda realizados bioensaios de dose-resposta para *An. gambiae* com o extrato mais eficaz, com os quais se determinou as seguintes concentrações letais (LC), LC50 de 140 g/L, LC90 de 310 g/L e LC99 de 580 g/L.

Com estes ensaios preliminares, conclui-se que extratos obtidos do reaproveitamento de resíduos de café podem ser uma promissora alternativa aos inseticidas atuais, porém, a metodologia utilizada necessita de algum melhoramento para a obtenção de extratos mais concentrados e consequentemente com maior efeito larvicida.

**Palavras-chave:** Cafeína, ácido clorogénico, tecnologia de membranas, *Anopheles*, larvicidas.

The (re)emergence vector-borne diseases, as filariasis and arboviruses (*e.g* dengue) is currently major global health problem, particularly in tropical and sub-tropical areas where access to health care is scarce. Insecticides remains the principal strategy in the control of vector-borne diseases, however, due to the overuse of these chemicals, the insecticide resistance of mosquitos has been increasing in last years. Thus, the implementation of new, sustainable and economically viable strategies to reduce vector populations are necessary, especially in low-rent countries.

The main propose of this work was to evaluation the larvicidal effects of extracts attained from coffee industry residues. These extracts were obtained through an innovative application of a known sustainable technology: the separation of compounds by membranes. The objective was to obtain extracts enriched in phenolic compounds, namely caffeine (CAF), and chlorogenic acid (CGA) based on this technology.

Initially were optimized several extraction conditions (extraction temperature, extraction time and extracting medium). Subsequently, parameters of rejection of these phenolic compounds and permeability values of different ultrafiltration and nanofiltration membranes were assessed in the achievement fractionated extracts enriched in phenolics compounds of interest.

Lastly, crude and fractionated extracts were concentrated by evaporation in a rotary evaporator.

The concentration levels for the concentrated crude extract were 2727, 763 and 797 mg L<sup>-1</sup> of total phenolics compounds, CAF and CGA, respectively. In fractionated and concentrated extract, recovered values obtained were 2267, 730 and 553 mg L<sup>-1</sup>, total phenolics compounds, CAF and CGA, respectively, of concentration levels.

Bioassays larvicidal was performed with concentrated crude and fractionated extracts through WHO standardized bioassays to insecticides in larvae of the 3<sup>rd</sup>/4<sup>th</sup> instar of *Anopheles gambiae* Gilles, 1972, *Anopheles stephensi* Liston, 1901 and *Anopheles atroparvus* Van Thiel, 1927, respectively, the main vector of malaria in Africa and Asia, and the former vector of this endemic disease in Europe. The mortalities occurred with the concentrated crude extract were 100% for *An. gambiae* and *An. stephensi* and 96% to *An. atroparvus*. With the concentrated extract fractionated mortalities were 99%, 95% and 54% for *An. gambiae*, *An. stephensi* and *An. atroparvus*, respectively.

Also were carried out dose-response bioassays in *An. gambiae* with the most effective extract, wherein the following lethal concentrations (LC) were determined, LC50 140 g.L<sup>-1</sup>, LC90 310 g.L<sup>-1</sup> and LC99 of 580 g.L<sup>-1</sup>.

These preliminary tests, showed that extracts reusing coffee residues may be a promising alternative to current pesticides, however, the methodology needs some improvement for obtaining more concentrated extracts and consequently more larvicidal effect.

**Keywords:** Caffeine, chlorogenic acid, membranes technology, *Anopheles*, larvicides.

# *Índice*

---

<i>Agradecimentos .....</i>	<i>ii</i>
<i>Resumo.....</i>	<i>iii</i>
<i>Abstract.....</i>	<i>iv</i>
<i>Índice .....</i>	<i>v</i>
<i>Índice de Figuras .....</i>	<i>x</i>
<i>Índice de tabelas .....</i>	<i>xii</i>
<i>Lista de abreviaturas .....</i>	<i>xiv</i>
<b>1 Introdução .....</b>	<b>1</b>
1.1 Enquadramento do problema .....	1
1.2 O mosquito e o seu ciclo de vida .....	2
1.2.1 Classificação taxonómica e morfologia .....	3
1.2.2 Ciclo de vida do mosquito.....	5
1.2.3 Comportamento biológico do mosquito.....	6
1.2.3.1 Espécies em estudo – Localização geográfica, desenvolvimento e hábitos comportamentais .....	7
1.3 Controlo vetorial .....	8
1.4 Importância do estudo de alternativas ao controlo vetorial químico .....	11
1.4.1 Resistências a inseticidas nas espécies em estudo .....	13
1.5 Extratos naturais como alternativa aos atuais químicos.....	14
1.6 Café e a sua importância .....	15
1.6.1 Classificação taxonómica e caracterização botânica .....	15

1.6.2	Composição química do café .....	17
1.6.3	O café e as suas propriedades.....	19
1.6.4	Café e o seu potencial efeito inseticida .....	20
1.7	Processo de separação com membranas.....	21
1.7.1	Definição de membrana .....	21
1.7.2	Processos de separação .....	23
1.7.3	Classificação das membranas.....	24
1.7.3.1	Classificação morfológica .....	24
1.7.3.2	Classificação química .....	24
1.7.4	Tipos de processos com membranas .....	25
1.7.4.1	Nanofiltração (NF) .....	25
1.7.4.2	Ultrafiltração (UF).....	25
<b>2</b>	<b>Objetivos.....</b>	<b>27</b>
2.1	Objetivos gerais e específicos .....	27
<b>3</b>	<b>Material e Métodos.....</b>	<b>29</b>
3.1	Materiais.....	29
3.1.1	Reagentes .....	29
3.1.2	Material biológico .....	29
3.1.3	Membranas .....	30
3.2	Equipamentos.....	31
3.2.1	Extrações .....	31
3.2.2	Instalação nano/ultrafiltração – Filtração frontal .....	32
3.2.3	Instalação do sistema nanofiltração/ultrafiltração – Filtração tangencial .....	33
3.2.4	Sistema de evaporação em rotavapor .....	35
3.3	Método experimental .....	35



3.3.1	Otimização do processo de extração .....	35
3.3.1.1	Otimização do meio e tempo de extração.....	35
3.3.1.2	Otimização da temperatura de extração .....	36
3.3.1.3	Cálculo de rendimentos .....	36
3.3.2	Otimização do fracionamento com membranas .....	36
3.3.2.1	Cálculo das rejeições dos compostos .....	37
3.3.2.2	Cálculo da permeabilidade média da membrana.....	38
3.3.2.3	Tratamento das membranas .....	38
3.3.3	Produção de extratos com as condições otimizadas.....	38
3.3.3.1	Obtenção dos extratos brutos.....	38
3.3.3.2	Obtenção extratos fracionados .....	39
3.3.4	Concentração de extratos fracionados e brutos .....	39
3.4	Métodos analíticos .....	39
3.4.1	Método Folin-Ciocalteu – Determinação dos fenólicos totais .....	39
3.4.2	Identificação e quantificação dos compostos fenólicos por HPLC.....	40
3.5	Estudo do efeito larvicida dos extratos de café.....	41
3.5.1	Colónia de mosquitos.....	41
3.5.2	Ensaio preliminares de toxicidade.....	42
3.5.3	Bioensaio larvicidas.....	43
3.5.4	Bioensaio larvicidas com compostos padrão .....	45
3.5.5	Tratamento e análise de dados .....	45
<b>4</b>	<b>Resultados .....</b>	<b>47</b>
4.1	Extração de compostos fenólicos totais, ácido clorogénico e cafeína, a partir de casca e polpa de café.....	47
4.1.1	Otimização da extração dos compostos-alvo .....	47

4.1.1.1	Otimização do tempo de extração e meio de extração .....	47
4.1.1.2	Otimização da aplicação do pré-tratamento em conjugação com a temperatura de extração .....	49
4.2	Otimização do processamento de extratos por nanofiltração/ultrafiltração .....	51
4.2.1	Estudo de membranas de nanofiltração e ultrafiltração em filtração frontal ...	51
4.2.2	Fracionamento do extrato bruto otimizado anteriormente recorrendo à membrana GH em modo de filtração frontal .....	54
4.3	Produção de extratos fracionados com condições otimizadas anteriormente em modo de filtração tangencial em escala superior .....	56
4.4	Concentração dos extratos obtidos por evaporação em rotavapor .....	59
4.5	Bioensaios larvicidas preliminares .....	59
4.5.1	Ensaio de toxicidade .....	59
4.5.2	Bioensaios preliminares com extratos de café não concentrados .....	60
4.5.3	Bioensaios preliminares com extratos aquosos de café concentrados .....	61
4.5.4	Bioensaios larvicidas com compostos padrão .....	62
4.5.5	Bioensaios dose-resposta do extrato bruto concentrado de resíduos de café ...	63
<b>5</b>	<b>Discussão e Conclusões.....</b>	<b>65</b>
5.1	Extração de compostos fenólicos e cafeína a partir de casca e polpa de café..	65
5.2	Otimização do processamento de extratos por nanofiltração/ultrafiltração à escala laboratorial.....	67
5.2.1	Estudo de membranas de nano e ultrafiltração em filtração frontal.....	67
5.3	Produção de extratos fracionados e brutos em escala superior e concentração dos mesmos por evaporação.....	69
5.4	Bioensaios larvicidas preliminares.....	70
5.4.1	Ensaio de toxicidade .....	70

5.4.2	Bioensaios preliminares com extratos de café não concentrados e concentrados em <i>Anopheles gambiae</i> , <i>Anopheles stephensi</i> e <i>Anopheles atroparvus</i> .....	70
5.5	Bioensaios dose-resposta do extrato de resíduos de café em bruto e concentrado .....	72
5.6	Considerações finais.....	72
<b>6</b>	<b>Referências Bibliográficas .....</b>	<b>74</b>

## *Índice de Figuras*

Figura 1. Situação epidemiológica da malária a nível mundial.....	2
Figura 2. (A) Anatomia geral de um mosquito; (B) Diferenças morfológicas entre anofelíneos machos e fêmeas .....	4
Figura 3. Ilustração de larvas de (a) subfamília Culicinae e (b) subfamília Anophelinae.....	5
Figura 4. Ilustração do ciclo de vida de um mosquito (Diptera; Culicidae).....	6
Figura 5. Mosquito <i>An. gambiae</i> a realizar uma refeição sanguínea. ....	7
Figura 6. Constituição das camadas do fruto de café.....	17
Figura 7. Representação da estrutura química da molécula de cafeína (A) e do ácido clorogénico (B) .....	19
Figura 8. Esquema do funcionamento de uma membrana. ....	22
Figura 9. Representação esquemática dos diferentes modos de filtração .....	23
Figura 10. Representação fotográfica da recolha da matéria-prima.....	30
Figura 11. Ilustração da montagem de um convencional extrator Soxhlet.....	31
Figura 12. Reator utilizado na extração de resíduos de café. Sistema acoplado por um sistema de agitação. Instalações da FCT-UNL (Faculdade de Ciências e Tecnologias da Universidade Nova de Lisboa).....	32
Figura 13. Configuração experimental do ensaio á escala laboratorial, modo de filtração frontal. ....	32
Figura 14. Representação esquemática do sistema de nano/ultrafiltração, modo de filtração tangencial. ....	34
Figura 15. Instalação de nano/ultrafiltração GEOsmonics .....	34
Figura 16. Ensaio de toxicidade preliminares em <i>An. gambiae</i> , com extratos obtido em H <sub>2</sub> O (W) e ácido cítrico em H <sub>2</sub> O (WHA). ....	43
Figura 18. Esquema geral dos bioensaios larvicidas .....	45
Figura 19. Cinética de extração de compostos fenólicos totais a temperatura de 100°C, a partir de resíduos de café sem pré-tratamento. ....	47
Figura 20. Cinética de extração de compostos fenólicos identificados a temperatura de 100 °C, a partir de resíduos de café sem pré-tratamento.....	48

Figura 21. Permeabilidades, $L_p$ ( $L \cdot m^{-2} \cdot bar^{-1} \cdot h^{-1}$ ), dos ensaios com as membranas NP010, UP005 e GH em função do fator de concentração, FC (-), a 5 bar e a 40°C. ....	51
Figura 22. Rejeições aparentes dos compostos de interesse, CGA e CAF, das membranas em estudo (GH, UP005 e NP010), em função do fator de concentração. ....	52
Figura 23. Permeabilidades dos ensaios com a membrana GH em função do fator de concentração, FC (-), a 5 bar e a 40°C e respectivo valor de permeabilidade média ( $L_{p\text{médio}}$ ). ....	54
Figura 24. Rejeição aparente dos compostos de interesse nos ensaios com a membrana GH a 40°C e 5 bar em modo de filtração frontal. ....	55
Figura 25. Permeabilidades dos ensaios com a membrana GH em modo de filtração tangencial, em função do fator de concentração, FC (-) e respectivo valor médio. ....	57
Figura 26. Rejeição aparente dos compostos de interesse nos ensaios com a membrana GH a 40°C em filtração tangencial. ....	57
Figura 27. Representação gráfica dos resultados dos bioensaios larvicidas em <i>An.gambiae</i> , <i>An.atroparvus</i> , <i>An.stephensi</i> com extratos aquosos de café. ....	62
Figura 28 Ensaio dose-resposta do extrato C em <i>An. gambiae</i> e respectiva equação da reta. ....	64

## *Índice de tabelas*

---

Tabela 1. Posição sistemática do género <i>Anopheles</i> de acordo com a classificação de Richards & Davies 1977. ....	3
Tabela 2 Classificação sistemática da planta de café, Clifford et al. (1989).....	16
Tabela 3. Composição química dos diferentes subprodutos do café.....	18
Tabela 4. Características das membranas poliméricas utilizadas.....	30
Tabela 5. Tabela resumo dos diferentes extratos utilizados nos bioensaios larvicidas.....	43
Tabela 6. Concentrações de fenólicos totais em eq.CGA e compostos identificados, CAF e CGA, em g, nos referidos meios de extração.....	49
Tabela 7. Rendimento de extração de fenólicos totais, em eq. CGA, e identificados (CGA e CAF), em g, extraído a partir de 1 kg de resíduo tal e qual, a temperatura de 100°C, sem pré-tratamento, com os referidos solventes. ....	49
Tabela 8. Concentrações de fenólicos totais em eq. CGA e compostos identificados, CAF e CGA, obtidos nas extrações à temperatura de 40°C e com pré-tratamento. ....	50
Tabela 9. Rendimento de extração de fenólicos totais, em eq. CGA, e identificados (CGA e CAF), em g, extraído a partir de 1 kg de resíduo tal e qual, do extrato obtido a temperatura de 40°C com pré-tratamento. ....	50
Tabela 10. Permeabilidade médias dos ensaios de fracionamento, a 5 bar e a 40°C para cada referida membrana. ....	51
Tabela 11.Rejeições aparente dos compostos de interesse nas referidas membranas em estudo, no permeado final. ....	52
Tabela 12. Composição dos extratos obtidos, após processo de separação com membranas, de compostos fenólicos totais e de compostos fenólicos identificados (CGA e CAF).....	53
Tabela 13. Rejeições aparentes de compostos fenólicos totais, CGA e CAF no final do ensaio, a 5 bar e 40 °C com a membrana GH .....	55

Tabela 14. Composição dos extratos obtidos após fracionamento em filtração frontal, de compostos fenólicos totais, e de compostos fenólicos identificados. ....	56
Tabela 15. Rejeições aparentes de compostos fenólicos totais e CGA E CAF, no durante o processamento dos extratos por filtração tangencial. ....	58
Tabela 16. Composição dos extratos obtidos após processo de fracionamento com membranas, de compostos fenólicos totais e de compostos fenólicos.....	58
Tabela 17. Composição dos extratos obtidos após concentração por evaporação em rotavapor, de compostos fenólicos totais e de compostos fenólicos identificados. ..	59
Tabela 18. Bioensaios de toxicidade em <i>An. gambiae</i> com os extratos obtidos com água (W) e com água+ácido cítrico 3g/L (WHA).....	60
Tabela 19. Efeito larvídico de extratos de café não concentrados em larvas de <i>An. gambiae</i> .....	61
Tabela 20. Efeito larvídico do extrato C em <i>Anopheles</i> .....	61
Tabela 21. Efeito larvídico do extrato D em <i>Anopheles</i> .....	61
Tabela 22. Efeito larvídico da solução com compostos-padrão em <i>An. stephensi</i> ..	63
Tabela 23. Ensaio dose-resposta do extrato C em <i>An. gambiae</i> .....	63
Tabela 24. Resultados da análise do modelo Probit para <i>An. gambiae</i> relativamente aos efeitos larvídicos dos extratos brutos concentrados. ....	64

## *Lista de abreviaturas*

---

<b>CAF</b>	Cafeína
<b>CGA</b>	Ácido clorogénico
<b>CIFC/IITC</b>	Centro de Investigação das Ferrugens do Cafeeiro/Instituto de Investigação Científica Tropical
<b>Da</b>	Daltons
<b>DDT</b>	Diclorodifeniltricloroetano
<b>DF</b>	<i>Dengue Fever</i>
<b>DNA</b>	Ácido desoxirribonucleico
<b>eq. CGA</b>	Equivalentes em ácido clorogénico
<b>FC</b>	Fator de concentração
<b>FCT-UNL</b>	Faculdade de Ciências e Tecnologias - Universidade Nova de Lisboa
<b>g/L</b>	Grama por litro
<b>HPLC</b>	Cromatografia líquida de alta eficiência
<b>ICO</b>	Organização Internacional de Café
<b>IGRs</b>	<i>Insect growth regulators</i>
<b>IHMT</b>	Instituto de Higiene e Medicina Tropical
<b>IRS</b>	<i>Indoor residual spraying</i>
<b>ITN</b>	<i>Insecticide-treated nets</i>
<b>kdr</b>	<i>Knock-down resistance</i>
<b>LAQV- Requimte</b>	Laboratório associado de química verde - Rede Química e Tecnologia
<b>L.m<sup>-2</sup>.bar<sup>-1</sup>.h<sup>-1</sup></b>	Litros por massa/bar/ hora
<b>LC</b>	Concentrações letais
<b>Lp</b>	Permeabilidade da membrana
<b>m</b>	massa
<b>M</b>	Mortalidade
<b>MF</b>	Microfiltração
<b>mg.L<sup>-1</sup></b>	Miligrama por litro
<b>MWCO</b>	Molecular weight cut-off



<b>Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub></b>	Carbonato de sódio
<b>NF</b>	Nanofiltração
<b>OI</b>	Osmose inversa
<b>OMS</b>	Organização Mundial de Saúde
<b>PA - TCF</b>	Poliamida <i>Thin-Film composite</i>
<b>PDA</b>	<i>Photo diode array</i>
<b>PES</b>	Polietérsulfona
<b>PSM</b>	Processos de separação com membranas
<b>Raparente</b>	Rejeição aparente
<b>RBM</b>	Roll Back Malaria
<b>Ri</b>	Rejeição do composto i
<b>RM</b>	Razão mássica
<b>RPM</b>	Rotação por minuto
<b>T</b>	Temperatura
<b>t<sub>extração</sub></b>	Tempo de extração
<b>THA</b>	Triponasomosose Humana Africana
<b>UF</b>	Ultrafiltração
<b>v/v</b>	Volume por volume
<b>W</b>	Solvente água
<b>WHA</b>	Ácido cítrico em água
<b>η<sub>i</sub></b>	Rendimento composto i

# ***1 Introdução***

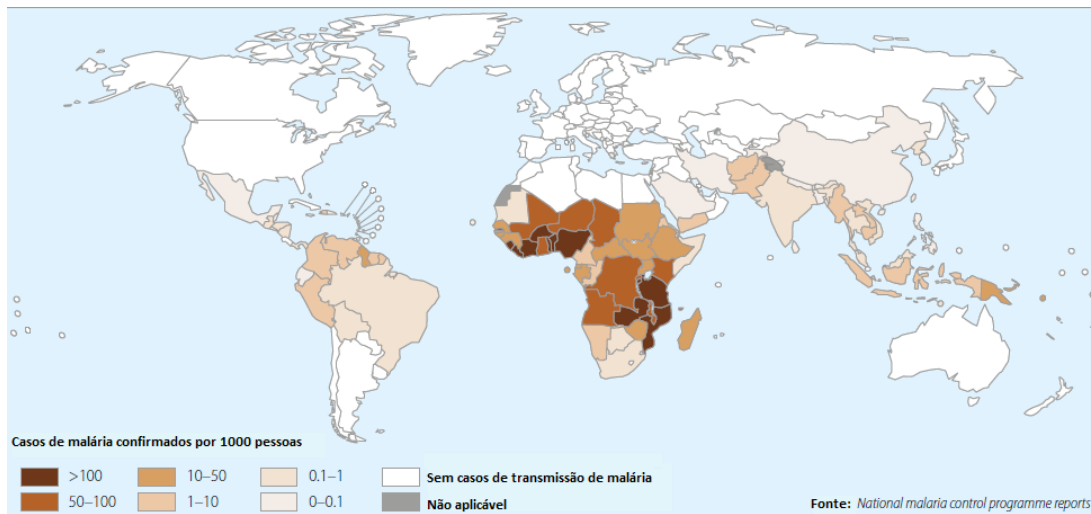
---

## **1.1 Enquadramento do problema**

A reemergência e o aumento das áreas de distribuição de doenças tais como a malária, febre da dengue (DF – Dengue Fever), filarioses, encefalite japonesa, febre do Nilo Ocidental, febre de chikungunya, doença de Lyme, tripanossomose humana africana (THA), entre outras, continuam a ser um dos maiores problemas de saúde a nível mundial, devido à elevada mortalidade e morbilidade que causam, maioritariamente, em regiões tropicais e subtropicais, onde o acesso a um sistema sanitário em condições é escasso (Mullen & Durden, 2009; Service, 1980). Todas estas doenças têm em comum a sua forma de transmissão entre humanos, um vetor artrópode. Nos casos, por exemplo, da malária, DF e filarioses, estas são doenças transmitidas por mosquitos. Associados à reemergência destas doenças encontram-se vários fatores entre os quais a inexistência de tratamento eficaz contra os agentes patogénicos e a ineficiência das medidas aplicadas no controlo do artrópode vetor (Hemingway & Ranson, 2000; WHO, 2004).

Este trabalho incide neste último aspeto, pesquisando novos compostos que possam atuar como inseticidas de várias espécies de mosquito do género *Anopheles* (Díptera; Culicidae). É neste género da família Culicidae que vamos encontrar várias espécies de mosquitos que, para além de serem agentes de incomodidade, devido às picadas que infligem, são também vetores responsáveis pela transmissão de uma das doenças com maior taxa de mortalidade, a malária. (WHO, 2014)

Segundo os dados mais recentes, em 2013, ocorreram cerca de 198 milhões de casos de malária, dos quais cerca 600 000 resultaram em mortes. A maioria dos casos e das mortes (aproximadamente 90%) ocorreram em África, na maioria em crianças com idades inferiores a 5 anos (cerca de 78%), sendo que os restantes ocorreram em regiões do sudoeste asiático, algumas regiões a oriente do mediterrâneo e na América do Sul (WHO, 2014), tal como representado na **figura 1**.



**Figura 1.** Situação epidemiológica da malária a nível mundial. Adaptação de WHO (2014).

Face a estes dados, existe a necessidade de tomar medidas urgentes no tratamento e propagação da doença o que confere ao controlo vetorial uma elevada relevância na estratégia global para a prevenção e erradicação da doença. O uso de inseticidas continua a ser a estratégia mais utilizada no controlo de vetores, contudo, devido ao uso excessivo destes químicos, nos últimos anos surgiram resistências nos vetores, tendo estas vindo a aumentar gradualmente. Perante este cenário, a OMS (Organização Mundial de Saúde) tem vindo a promover a integração do uso de diferentes métodos de controlo, de forma a prevenir ou reduzir a interação entre vetor e humano de forma sustentável e economicamente viável em países em desenvolvimento (Beier, et al., 2008; WHO, 2004). De entre estas estratégias encontram-se vários programas de incentivo à pesquisa e desenvolvimento de novos compostos inseticidas (TDR/WHO, 2002; RBM/WHO, 2008), nomeadamente, compostos de origem natural que possam ser facilmente obtidos, por processos pouco sofisticados, e de baixo preço.

### 1.2 O mosquito e o seu ciclo de vida

Neste estudo será avaliada a biossensibilidade de novos compostos em mosquitos do género *Anopheles*, nomeadamente, em *Anopheles gambiae* Giles, 1962, *Anopheles atroparvus* van Thiel, 1927 e *Anopheles stephensi* Liston, 1901, três espécies de mosquitos de diferentes proveniências geográficas, todas com relevância em Medicina.

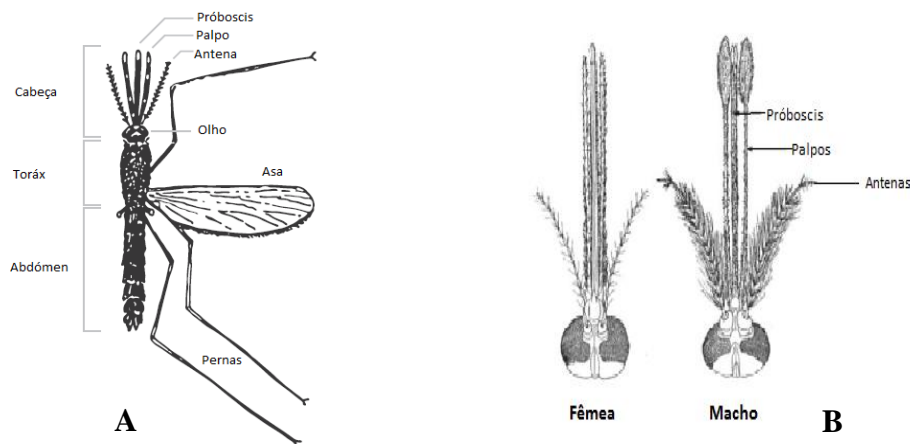
### 1.2.1 Classificação taxonômica e morfologia

Os mosquitos do género *Anopheles* pertencem à família Culicidae, que por sua vez, subdivide-se em três subfamílias: Anophelinae, Culicinae e Toxorhynchitinae. Nestas subfamílias encontramos os géneros *Anopheles*, *Culex* e *Aedes* que apresentam maior número de espécies e subespécies com relevância na saúde humana. Na **tabela 1** encontra-se representada a posição sistemática do género *Anopheles*, de acordo com a classificação taxonômica de Richard & Davies, 1977.

**Tabela 1.** Posição sistemática do género *Anopheles* de acordo com a classificação de Richards & Davies 1977.

Classificação Taxonômica	
<b>Reino</b>	Animalia
<b>Filo</b>	Arthropoda
<b>Classe</b>	Insecta
<b>Ordem</b>	Diptera
<b>Família</b>	Culicidae
<b>Subfamília</b>	Anophelinae
<b>Género</b>	<i>Anopheles</i>

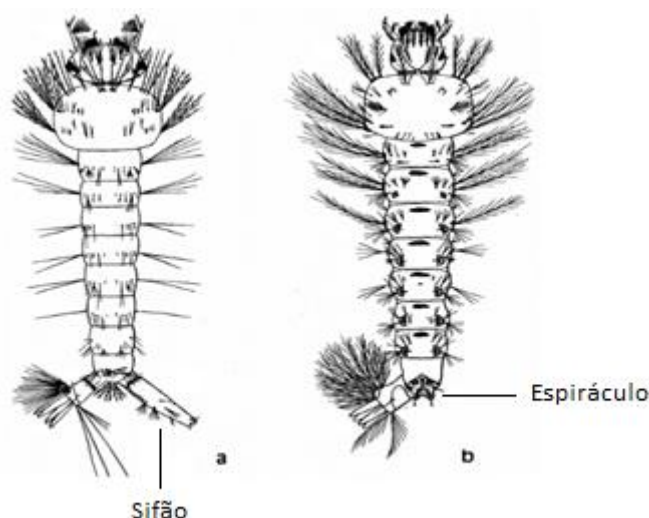
As formas adultas da Família Culicidae apresentam um único par de asas, tal como a maioria dos Diptera. Os mosquitos são insetos com cerca de 4-6 cm de comprimento, estrutura delgada, e corpo dividido em cabeça, tórax e abdómen tal como representado na **figura 2.A** (Service, 1980). Os machos distinguem-se das fêmeas pelas antenas plumosas que os caracterizam, enquanto as fêmeas apresentam antenas pilosas, tal como representado na **figura 2.B**.



**Figura 2.** (A) Anatomia geral de um mosquito; (B) Diferenças morfológicas entre anofelíneos machos e fêmeas. Adaptada de WHO (1994) e Gordon & Lavoipierre (1962)

Os machos alimentam-se apenas de néctares e as fêmeas, para além de néctar, necessitam também de refeições sanguíneas periódicas para o desenvolvimento dos seus ovos. Estas espécies que necessitam de efetuar uma refeição sanguínea para realizar uma postura de ovos são chamadas de anautogénicas. Apenas as espécies da subfamília Toxorhynchitinae e escassas espécies das restantes subfamílias não partilham esta característica. Espécies cujas fêmeas são capazes de efetuar, pelo menos, uma postura de ovos sem necessidade de uma refeição sanguínea são denominadas de autogénicas (Almeida, 2011; Service, 1980).

O corpo de uma larva é composto pela cabeça, por um largo e achatado torax e um abdómen com 10 segmentos. Dependendo do género, a cabeça pode variar na forma, desde oval a retangular, com antenas delgadas e cobertas por sedas. A boca é constituída por sedas orais que filtram partículas em suspensão na água. O tórax é sempre mais largo que a cabeça ou que o abdómen e coberto por sedas de dimensão e ramificação variável. No 8º segmento do abdómen estão presentes as estruturas respiratórias. Nas subfamílias Culicinae e Toxorhynchitinae, as aberturas do sistema respiratório, os espiráculos, encontram-se na extremidade de uma estrutura cónica designada de sifão (**figura 3a**). Na subfamília Anophelinae, os espiráculos encontram-se na superfície dorsal do abdómen (**figura 3b**) (Service, 1980; Marquadt, 2010).



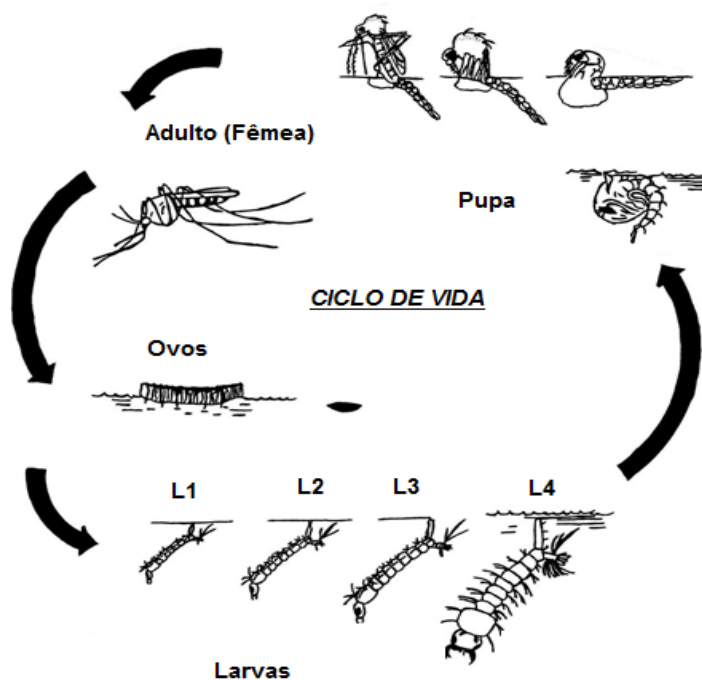
**Figura 3.** Ilustração de larvas de (a) subfamília Culicinae e (b) subfamília Anophelinae. Adaptado de Marquardt et al. (2010)

### 1.2.2 Ciclo de vida do mosquito

Os mosquitos são insetos holometabólicos, com metamorfoses completas, em que as formas imaturas, ovo, larvas e pupas, se diferenciam da forma adulta, do ponto de vista morfológico, assim como, do tipo de nicho ecológico que exploram, evitando competição de recursos entre as formas imaturas e adultas. Assim, o seu ciclo de vida passa-se em dois meios; no meio aquático, onde desenvolvem-se as formas imaturas e no meio terrestre/aéreo, onde vivem os adultos (Almeida, 2011).

O desenvolvimento de cada uma das fases e estado varia conforme as espécies, condições atmosféricas e o acesso ao alimento, sendo que o ciclo de vida do mosquito desde o ovo ao estado adulto pode durar 7 dias, a uma temperatura média de 31°C, a 20 dias a 20°C (Service, 1986; Almeida, 2011). A oviposição é a primeira etapa do ciclo de vida de um mosquito, contudo, a determinação do local da oviposição por parte da fêmea grávida difere entre espécies, pois cada espécie apresenta preferências por criadouros com propriedades químicas e físicas específicas (Mullen & Durden, 2009). Passado 1-2 dias, as larvas eclodem dos ovos e passam por 4 estados de desenvolvimento, designados por L1 a L4 (**figura 4**). A larva em estado L4 sofre uma metamorfose para pupa. Esta última fase por norma demora entre. 1 a 2 dias, após os

quais emerge o adulto. As larvas e pupas, como já referido, desenvolvem-se em meio aquáticos, que não são mais do que qualquer coleção de água, natural ou artificial, temporária ou permanente, como poças de chuva, lagos. O ciclo de vida fica completo quando a fêmea fecundada, efetua uma refeição sanguínea num hospedeiro de forma a iniciar a maturação dos ovos e recomeçar um novo ciclo após a oviposição dos mesmos (Service, 1986; Almeida, 2011).



**Figura 4.** Ilustração do ciclo de vida de um mosquito (Diptera; Culicidae). Adaptado de <http://www.wumcd.org/mosquito/lifecycle.html> (Acedido 5 março 2015)

### 1.2.3 Comportamento biológico do mosquito

Como já referido, as fêmeas são hematófagas, necessitando de picar um hospedeiro para efetuar uma refeição sanguínea (**figura 5**), antes ou após acasalar, de forma a obter os nutrientes necessários ao desenvolvimento dos seus ovos e completar o seu ciclo gonotrófico.

O conhecimento dos hábitos de picada dos mosquitos, tal como o local de repouso dos mesmos, são parâmetros muito relevantes para estudos epidemiológicos, nomeadamente, para encontrar medidas de controlo vetorial mais eficientes.



**Figura 5.** Mosquito *An. gambiae* a realizar uma refeição sanguínea. Foto de W.A.Foster retirada Mullen & Durden (2009)

Os mosquitos fêmeas têm certas afinidades para um determinado tipo de hospedeiro, podendo este ser humano e/ou animal, conferindo-lhes assim a característica de antropofílicas e/ou zoofílicas, respetivamente. Estas características devem-se a determinados estímulos libertados pelos hospedeiros, como o odor corporal, dióxido de carbono ou calor, sendo que algumas espécies são também atraídas pelo movimento ou forma do hospedeiro (Service, 1980). Quanto ao hábito de picada, algumas espécies são endofágicas, ou seja, têm preferência pelo interior das casas para efetuar a refeição, enquanto as exofágicas preferem o exterior. Após a refeição sanguínea a fêmea passa por um período de repouso para a digestão e maturação dos ovos. Este repouso pode ocorrer fora ou dentro das habitações, sendo assim a espécie designada de exofílica ou endofílica respetivamente. O local de repouso nem sempre coincide com o lugar onde se deu a refeição sanguínea (Service, 1986).

### **1.2.3.1 Espécies em estudo – Localização geográfica, desenvolvimento e hábitos comportamentais**

O mosquito *Anopheles gambiae* s.s. é predominante em África subsariana, sendo considerado o vetor mais eficiente de malária. O crescimento larvar ocorre essencialmente em habitats temporários, como tais como poças de água. A picada tende a ocorrer predominantemente no interior, e a maioria das populações são marcadamente antropofílicas, embora em algumas áreas possam também alimentar-se em animais



domésticos. Quanto ao local de repouso após refeição, as populações desta espécie são geralmente consideradas como endofílicas (Service, 1986; Sinka, et al., 2010).

*Anopheles atroparvus* é um mosquito europeu, responsável pela transmissão de malária, quando esta era endêmica na Europa (Zulueta, et al., 1975). O desenvolvimento larvar ocorre em locais ensolarados, em coleções de águas de média-grandes dimensões, expostas à luz solar, de água doce ou salobra, ocorrendo frequentemente em campos agrícolas de arroz. Esta espécie é mais zoofílica que antropofílica, podendo ser encontrada em estábulos, vacarias ou pecuárias. As fêmeas entram em hibernação parcial no inverno, emergindo periodicamente para a refeição sanguínea em humanos ou animais, dependendo do local de abrigo (Service, 1986; Sinka, et al., 2010).

A espécie *Anopheles stephensi* tem uma elevada relevância médica na região do Médio-Oriente, subcontinente Indiano e China, sendo o principal vetor de *Plasmodium falciparum*, Welch, 1897 e *Plasmodium vivax*, Grassi & Feletti 1890, nessas áreas, principalmente em áreas urbanas. O desenvolvimento larvar ocorre em vários locais, dependendo de se tratar de uma zona rural ou urbana, tendo assim preferência por poças de água doce, leitos e margens dos rios, recipientes domésticos que armazenam água, locais de construção ou locais industriais. Esta espécie é considerada endofílica e endofágica, embora nos meses mais quentes tenham tendência para picar ao ar livre, devido à maior presença de humanos no exterior. Verifica-se também que nas áreas urbanas o mosquito tem um comportamento antropofílico mais pronunciado (Service, 1986; Sinka, et al., 2010).

### 1.3 Controlo vetorial

O controlo vetorial, como já referido, faz parte da estratégia global para a prevenção das principais doenças transmitidas por vetores, sendo em alguns casos a única opção para algumas doenças, como a dengue ou febre de chikungunya, entre outras (WHO, 2004). Algumas das razões que levaram ao aparecimento ou reaparecimento destas doenças transmitidas por vetores estão frequentemente associadas a mudanças nos sistemas de saúde pública ou ao aparecimento de resistências aos fármacos e inseticidas existentes (Gubler, 1998).

Porém, muitos têm sido os esforços para criar alternativas para o controlo de mosquitos, principalmente para os vetores responsáveis pela malária. As estratégias de

controle podem ser aplicadas nas formas imaturas e/ou nas formas adultas, podem passar pela eliminação ou diminuição do acesso a criadouros favoráveis ao desenvolvimento das formas imaturas, pelo uso de inseticidas de forma a reduzir a longevidade do mosquito ou por uma combinação de diferentes medidas (Service, 2008).

Os principais objetivos do controle vetorial são a diminuição da densidade populacional de mosquitos de modo a que a sua atividade de incomodidade seja minimizada e a transmissão de doenças seja reduzida ou interrompida, com o mínimo de efeitos adversos para o ambiente.

Os métodos de controle a aplicar devem de ser sustentáveis e socioeconomicamente viáveis, considerando os recursos disponíveis (WHO, 2004). Em regra as estratégias de controle vetorial dividem-se em 4 tipos: controle biológico, controle genético, gestão ambiental e controle químico (Wermelinger & Ferreira, 2013).

O **controle biológico** refere-se a redução de densidades ou a alteração no desenvolvimento de uma população vetora com a utilização de agentes predadores, competidores, parasitas e de produtos de origem biológica, como é o caso de hormonas e feromonas que alteram o processo de metamorfose e acasalamento, respetivamente (Pates & Curtis, 2005). O **controle genético** é um método que visa provocar alterações genéticas no vetor, que diminuem a densidade da população de mosquitos ou a sua capacidade de transmissão do agente etiológico. A **gestão ambiental** consiste na alteração do meio físico onde se insere o vetor de modo a torná-lo hostil ao desenvolvimento da população vetorial, passando pela destruição, alteração e eliminação de todos os potenciais biótopos larvares, melhoramento do sistema de saneamento de águas e implementação de medidas de educação sanitária para a população humana, de forma a evitar comportamentos de risco que aumentem o contato com os mosquitos e consequentemente, a transmissão de doenças (Ramirez, et al., 2009). Este tipo de programas depende da implementação de políticas inerentes a cada região afetada de forma a tornar o processo autossustentável.

Por último, o **controle químico** é o principal recurso ao combate de vetores de doenças, sendo a ferramenta mais utilizada desde os meados do século XX até à atualidade, por ter mostrado ser bastante eficiente na redução das densidades de vetores com importância médica/veterinária (Becker, et al., 2003; Hemingway & Ranson,

2000). O controlo químico pode ser implementado através de inseticidas, reguladores de crescimento ou repelentes que visam diminuir a população de insetos ou limitar o contacto destes com o ser humano. Existem quatro grupos de compostos químicos que são utilizados como inseticidas, nomeadamente no controlo de mosquitos: os organoclorados, os organofosforados, os piretróides e os carbamatos.

Os **organoclorados** foram os primeiros inseticidas sintéticos. Neste grupo está inserido o diclorodifeniltricloroetano (DDT) (Braga & Valle, 2007) que atua nos canais de sódio das células nervosas, provocando paralisia e consequentemente a morte do inseto. Aplicação deste químico foi proibida pela OMS por questões ambientais, devido à sua persistência e elevada carga residual, e por questões de saúde devido à sua elevada toxicidade (van den Berg, 2009). Os químicos mais utilizados no controlo larvar pertencem ao grupo **organofosforados**, que têm a vantagem de terem elevados níveis de biodegradabilidade e de não se acumularem nos tecidos biológicos. Contudo é necessária a sua aplicação tem de ser frequente. Neste grupo estão inseridos o *temephos*, que não apresenta toxicidade para os mamíferos, o malatión ou o fentião (Service, 2008).

Os **piretróides** à semelhança dos organofosforados, são também biodegradáveis e com baixa toxicidade para os mamíferos, mas para seres aquáticos são bastante tóxicos. Têm um mecanismo de ação semelhante ao do DDT afetando o sistema nervoso dos insetos (Service, 2008; Service, 1986).

Por fim, os **carbamatos** atuam de forma semelhante aos organofosforados, contudo as reações são reversíveis, permitindo a recuperação dos insetos quando aplicados em doses baixas. Os carbamatos são normalmente utilizados quando a população de insetos é resistente aos produtos do grupo dos organofosforados e organoclorados (Service, 2008).

No controlo químico aplicado aos mosquitos adultos, os seus hábitos comportamentais têm uma grande influência no sucesso da aplicação deste tipo de estratégia de controlo. O conhecimento dos hábitos de repouso, no interior das habitações antes e/ou após as refeições é, por exemplo, relevante quando se prevê a aplicação de inseticidas residuais por pulverização de superfícies interiores de habitações ou abrigos para os animais. Esta técnica designada pela sigla IRS (*indoor*

*residual spraying*) foi uma das principais estratégias no controlo dos vetores da malária. (van den Berg, 2009)

Das quatro classes de inseticidas que estão disponíveis para IRS contra vetores de malária, apenas os piretróides são recomendados pela OMS para as redes mosquiteiras tratadas com inseticidas (ITN – *insecticide-treated nets*), sendo esta uma importante medida recomendada pelo programa Roll Back Malaria (RBM) para a prevenção de malária em África (RBM/WHO, 2008; Zaim & Guillet, 2002; WHO, 2014).

Os reguladores de crescimento de insetos (IGRs – *insect growth regulators*), uma classe adicional de inseticidas, são compostos químicos que atuam no desenvolvimento dos estados imaturos dos insetos, inibindo a formação de quitina. O uso dos IGRs aparenta ser uma alternativa favorável ao uso dos organofosforados, por ter um baixo impacto nas outras espécies, baixo custo e elevada eficiência. Nesta classe de inseticidas insere-se o pireproxifeno ou metopreno (Service, 2008).

### 1.4 Importância do estudo de alternativas ao controlo vetorial químico

Problemas operacionais, financeiros e de gestão, juntamente com as mudanças ambientais, o aparecimento de resistências aos inseticidas no vetor e a fármacos no agente patogénico, o aumento da população, a urbanização progressiva e migração e mudanças na prevenção e/ou resposta de emergência têm contribuído para o aumento da prevalência de doenças transmitidas por vetores (Gubler, 1998).

Dos fatores anteriormente enumerados, destaca-se as resistências aos inseticidas utilizados na atualidade, visto que estes quase sempre fazem parte das estratégias de controlo deste tipo de patologias.

O aparecimento e aumento das resistências ao piretróides, juntamente com a impossibilidade de utilização de outros tipos de inseticidas, devido a normativas nacionais ou a razões ambientais, são duas das mais importantes questões que, atualmente, confrontam os programas de controlo existentes. Ainda que muito lentamente, novas alternativas químicas para o uso em saúde pública vão aparecendo (Brogdon & McAllister, 1998; Zaim & Guillet, 2002; WHO, 1992).

A resistência, no âmbito de entomologia médica, define-se como a incapacidade dos inseticidas, às doses recomendadas, matarem uma população vetora-alvo (WHO 1998, WHO, 2012). O aparecimento de resistências em determinada população de vetores depende da concentração e da frequência em que são aplicados os inseticidas e das características inerentes à espécie envolvida. Por exemplo, insetos com longos ciclos de vida e com produção de descendência reduzida são menos propensos ao desenvolvimento de resistências. Tal é o caso das espécies de *Glossina* (vulgo, mosca Tsé-tsé), transmissoras de THA, em que a aplicação de DDT, durante longos programas de controlo nunca desencadeou o aparecimento de resistências ao mesmo. Tal não sucedeu com os mosquitos, que tem um curto ciclo de vida e abundante progenia (Hemingway & Ranson, 2000).

Atualmente, já se encontram documentados quais os mecanismos de resistências aos inseticidas mais comuns nos mosquitos. Neste grupo de insetos foram identificados dois tipos principais de resistência: a resistência comportamental e a resistência fisiológica. A resistência comportamental refere-se à capacidade do vetor evitar o inseticida, por alterações de comportamento ou por mudança de habitat; i.e. uma população vetora que tem, inerentemente, um comportamento endofílico, devido a contato constante com um inseticida pode passar a apresentar um comportamento exofílico (Service, 1980).

A resistência fisiológica, o tipo de resistência mais importante, resulta do aparecimento de alterações genéticas que são selecionadas devido à pressão seletiva exercida pelo uso contínuo de inseticidas (Service, 1980).

Em relação a este tipo de mecanismo de resistência, esta pode ser induzida por mutações pontuais que resultam na perda da sensibilidade dos locais alvo do inseticida (resistência local-alvo) ou por uma variada gama de alterações genéticas que resultam no aumento da taxa de destoxificação de inseticidas (resistência metabólica) (Brogdon & McAllister, 1998; Hemingway & Ranson, 2000).

Um dos mecanismos de resistência aos piretróides e ao DDT é caso da resistência local alvo “*knock-down resistance*” (*kdr*), que se trata de uma mutação pontual no gene que codifica os canais de sódio das células dos mosquitos (Brogdon & McAllister, 1998; Hemingway & Ranson, 2000).

A resistência metabólica consiste em mecanismos de destoxificação de xenobióticos que são degradados, através de vias enzimáticas, em moléculas não tóxicas. As enzimas que estão envolvidas no metabolismo dos xenobióticos encontram-se divididas em enzimas de Fase I e enzimas de Fase II. As enzimas de Fase I, como as do citocromo P450 e esterases, reconhecem e atuam diretamente sobre o composto exógeno, como um inseticida, metabolizando-o num substrato que será utilizado pelas enzimas de Fase II, como as glutatíon-S-transferases (Hemingway & Ranson, 2000).

### 1.4.1 Resistências a inseticidas nas espécies em estudo

O aparecimento e expansão das resistências a inseticidas nas populações de mosquitos vetores constituem uma preocupação constante relativamente ao controlo de doenças transmissíveis por esses mesmos vetores. Assim, é importante que haja conhecimento e monitorização das resistências a inseticidas na população vetora-alvo, para que se possam implementar estratégias de controlo adequadas e eficazes (Coleman & Hemingway, 2007)

Em *An. gambiae*, está descrito na literatura, resistências às quatro classes de inseticidas em populações de diferentes países endémicos. Hunt, et al. (2011) descreve para a zona oeste do Gana, em quatro localidades diferentes, resistências para todas as classe de inseticidas, excepto para os organofosfatos. Kanza e os seus colaboradores, descrevem resistência ao pireteróides, DDT e malatíon na República do Congo (Kanza, et al., 2013). Estão também descritas resistências a exposição de DDT e/ou permetrina, estando estas associadas a elevados níveis de poluição e agricultura urbana (Antonio-Nkondjio, et al., 2011).

Relativamente à espécie *An. stephensi*, estão descritas resistências ao malatíon, dieldrina e DDT em algumas regiões da Ásia, onde é predominante (Djadid , et al., 2006; Tiwari, et al., 2010; Vatandoost, et al., 2005). Quanto ao *An. atroparvus*, estão documentadas na literatura, resistências ao fentião, DDT e aos carbamatos (Hemingway, 1982; Mosna, et al., 1959).

Assim, não obstante os esforços efetuados pela OMS na implementação de alternativas aos atuais programas de controlo vetorial, como é o caso do controlo biológico, existe a necessidade urgente de encontrar novos produtos inseticidas de

elevada eficácia, de acordo com o que está estabelecido nos programas (Forattini, 2002).

### **1.5 Extratos naturais como alternativa aos atuais químicos**

A resistência aos inseticidas, como têm vindo a ser referido, ocorre na maioria dos artrópodes, essencialmente naqueles com importância médica. Esta ocorre para todas as classes químicas de inseticidas incluindo microbianos e reguladores de crescimento de insetos (Brogdon & McAllister, 1998).

Face a esta problemática, os produtos naturais de origem vegetal aparecem como uma fonte promissora de compostos bioativos que podem ser úteis na atuação contra insetos, como larvicidas, ovicidas e /ou adulticidas (Shaalan, et al., 2005). Estes compostos bioativos estão muitas vezes associados aos mecanismos de defesa das plantas contra inimigos naturais (Howe & Jander, 2008; War, et al., 2012); têm a vantagem de serem biodegradáveis, com menores riscos ambientais e apresentam, na sua generalidade, maior especificidade para os organismos-alvo (Grayer & Kokubun, 2001; Sukumar, et al., 1991).

Vários têm sido os estudos efetuados com diversas espécies de plantas, de diferentes regiões geográficas, que têm demonstrado que derivados destas apresentam efeitos de toxicidade nos insetos (Rocha, 2013; Amer & Mehlhorn, 2006; Benelli, et al., 2012). Verificou-se também que, o uso de extratos naturais exibe efeitos adversos na eclosão de ovos de mosquitos e na sua fecundação, para além de que mostraram ter importantes propriedades larvicidas e ação como reguladores de crescimento (Amer & Mehlhorn, 2006; Giatropoulos, et al., 2012; Kumar, et al., 2011; Tabanca, et al., 2012).

Embora apresentem toxicidade baixa, maior seletividade e degradação rápida, o uso destes bioinseticidas apresenta algumas desvantagens como: (i) a escassez da matéria-prima; (ii) a inexistência de padronização química e controlo de qualidade, (iii) custos elevados e, por vezes; (iv) a necessidade de serem utilizados conjuntamente com compostos sinérgicos (Rocha, 2013). Alguns compostos já estudados, como a nicotina foram importantes fitoquímicos com propriedades inseticidas usados antes da introdução de inseticidas orgânicos sintéticos, em países desenvolvidos (Sukumar, et al., 1991; Opende & Dhaliwal, 2000). Em suma, uso de produtos naturais como inseticidas

aparenta ser uma potencial alternativa aos recursos existentes, contudo existe ainda uma enorme carência de pesquisa neste campo (Rocha, 2013).

### 1.6 Café e a sua importância

No sentido de encontrar alternativas viáveis e economicamente favoráveis, este estudo teve por base avaliar a potencial atividade inseticida de resíduos provenientes da indústria de café.

Segundo a Organização Internacional de Café (ICO), o café é a mercadoria proveniente da agricultura tropical mais exportada mundialmente, sendo o Brasil o maior exportador, com cerca de 30% das exportações (ICO, 2015). O café é a bebida mais consumida em todo o mundo, todos os dias, por milhares de pessoas, e, nos últimos 150 anos a sua importância comercial aumentou consideravelmente (Daglia, et al., 2000; Freedman, et al., 2012). Até se obter o café consumível, o fruto passa por vários processos tecnológicos, nomeadamente, pela remoção das camadas, desde a casca até à camada que reveste a semente do café (**figura 6**). Tal leva a uma produção elevada de resíduos sólidos de baixo valor (visto que quase 50% do fruto é descartado) da qual apenas uma pequena percentagem é reutilizada, atualmente, para fins agrícolas. Porém, o uso destes resíduos como fertilizante não é recomendado, por conter elevadas concentrações de compostos orgânicos e elevada toxicidade associada à presença de compostos fenólicos (Esquivel & Jimenez, 2012; Cruz, et al., 2012).

Embora o uso de resíduos de café sólidos não seja viável, estudos realizados com intuito de valorizar este subproduto da indústria de café, demonstraram que é possível obter extratos com concentrações elevadas de compostos fenólicos, incluindo cafeína, aumentando a sua aplicabilidade noutras indústrias. (Brazinha, et al., 2014; Cruz, et al., 2012).

#### 1.6.1 Classificação taxonómica e caracterização botânica

O café provém de um arbusto pertencente à família *Rubiaceae* e ao género *Coffea* (**tabela 2**) (Clifford, et al., 1989). Os membros da família *Rubiaceae* são maioritariamente tropicais ou subtropicais, distribuindo-se entre o trópico de Caranguejo e Capricórnio, onde a estação das chuvas é abundante e a temperatura média anual ronda os 21°C. Esta família incluiu cerca de 400 géneros e 4800 a 5000 espécies.

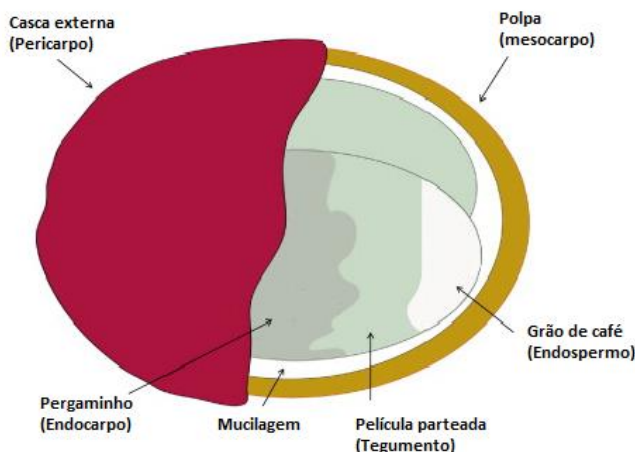


No género *Coffea* destacam-se duas espécies pela sua importância comercial a nível mundial, *Coffea arabica* (Arábica), que suporta cerca de 75% da produção de café e *Coffea canephora* (Robusta) que providencia 25% da produção mundial (Belitz, et al., 2009).

**Tabela 2** Classificação sistemática da planta de café, Clifford et al. (1989)

<b>Classificação Taxonómica</b>	
<b>Reino</b>	Plantae
<b>Filo</b>	Magnoliophyta
<b>Classe</b>	Magnoliopsida
<b>Ordem</b>	Rubiales
<b>Família</b>	Rubiaceae
<b>Género</b>	Coffea

Como já referido, a baga de café consiste em várias camadas, a camada externa ou pericarpo, com uma superfície lisa e dura, avermelhada ou amarelada (consoante o genótipo) quando o fruto se encontra maduro. Esta camada envolve uma amarelada, suave e fibrosa polpa ou mesocarpo, seguida por uma camada translúcida, incolor, fina, viscosa e altamente hidratada camada de mucilagem ou de pectina. De seguida está o endocarpo ou pergaminho, de cor amarelada, e por fim a revestir semente de café (endosperma) está o tegumento ou película prateada. A constituição do fruto de café está representada na **figura 6**.



**Figura 6.** Constituição das camadas do fruto de café. Adaptado de Esquivel & Jimenéz (2012)

### 1.6.2 Composição química do café

As várias etapas do processamento de café originam diferentes tipos de resíduos, cuja sua composição química difere entre si, como se pode verificar na **tabela 3**. Neste trabalho destaca-se as propriedades químicas da casca e da polpa do café. Estes são ricos em hidrocarbonetos (35%), proteínas (5,2 %), fibras (30,8%) e minerais (10,7 %) (Brand et al,2001). Embora não seja viável o uso destes subprodutos do café para a alimentação de animais, devido a presença de compostos antinutricionais e antifisiológicos como a cafeína e taninas, (Brand, et al., 2000; Orozco, et al., 2008; Pandey, et al., 2000; Ulloa Rojas, et al., 2002) estes resíduos são, contudo, uma fonte de compostos fitoquímicos com elevada aplicabilidade na indústria alimentar e farmacêutica.

De todos os compostos presentes na composição química do fruto do café, neste presente trabalho, será dado destaque a dois compostos: o ácido clorogénico (CGA) e a cafeína (CAF).

O ácido clorogénico é um composto fenólico com peso molecular de 354 g/mol, presente em vários resíduos da indústria agro-alimentar (**figura 7B**) (NIH, 1993). Ramirez-Coronel, et al., (2004), encontrou uma elevada quantidade de polifenóis em polpa de café Arábica. Dos compostos fenólicos identificados por Ramírez (1988), cerca de 42,2% referem-se a ácido clorogénico (CGA). Para além deste composto foram

também identificados muitos outros compostos fenólicos, embora em menor quantidade, como o ácido ferúlico (1%).

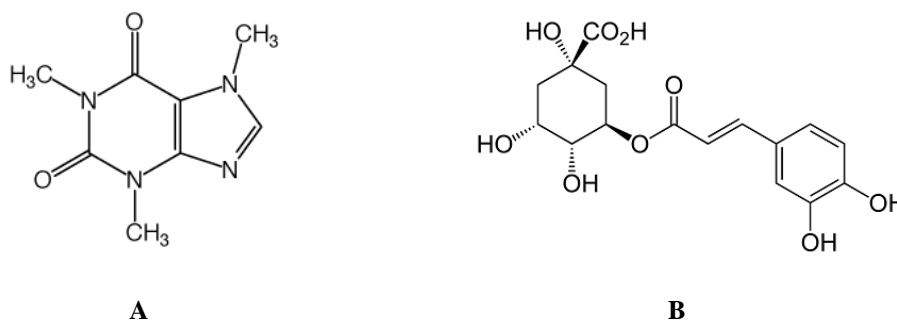
A cafeína (1,3,7-trimethylxantina), é uma molécula com peso molecular 193 g/mol (NIH, 1993), (**figura 7A**) que para além de ser um componente do café, é também encontrada no chá, entre outras bebidas. Ramirez-Coronel, et al., (2004) identificaram níveis significantes de cafeína (CAF) nas várias camadas do fruto do café, desde o pericarpo até à semente. Contudo, as quantidades de cafeína variam conforme o genótipo e as fases de desenvolvimento do fruto. Sabe-se, por exemplo, que a cafeína não é sintetizada nas fases mais tardias do desenvolvimento do fruto, ou seja, a cafeína que é sintetizada nas fases iniciais será aquela que estará presente no fruto amadurecido (Koshiro, et al., 2006).

Outro composto importante presente na polpa do café é a tanina condensada, cuja concentração aumenta durante a secagem e difere entre as diversas variedades de café. (Clifford & Ramirez-Martinez, 1991; Colmenares, et al., 1994).

**Tabela 3.** Composição química dos diferentes subprodutos do café. Adaptado de Murthy & Naidu (2012)

Composto (%)	Polpa de café	Casca de café	Película prateada	Borras de café
Celulose	63.0 ± 2.5	43.0 ± 8.0	17.8 ± 6.0	8.6 ± 1.8
Hemicelulose	2.3 ± 1.0	7.0 ± 3.0	13.1 ± 9.0	36.7 ± 5.0
Proteína	11.5 ± 2.0	8.0 ± 5.0	18.6 ± 4.0	13.6 ± 3.8
Ácidos gordos	2.0 ± 2.6	0.5 ± 5.0	2.2 ± 1.9	ND
Fibra total	60.5 ± 2.9	24 ± 5.9	62.4 ± 2.5	ND
Polifenóis totais	1.5 ± 1.5	0.8 ± 5.0	1.0 ± 2.0	1.5 ± 1.0
Açúcares totais	14.4 ± 0.9	58.0 ± 20.0	6.65 ± 1.0	8.5 ± 1.2
Substâncias pécicas	6.5 ± 1.0	1.6 ± 1.2	0.02 ± 1.0	0.01 ± 0.005
Lignina	17.5 ± 2.2	9.0 ± 1.6	1.0 ± 2.0	0.05 ± 0.05
Taninas	3.0 ± 5.0	5.0 ± 2.0	0.02 ± 0.1	0.02 ± 0.1
Ácido clorogénico	2.4 ± 1.0	2.5 ± 0.6	3.0 ± 0.5	2.3 ± 1.0
Cafeína	1.5 ± 1.0	1.0 ± 0.5	0.03 ± 0.6	0.02 ± 0.1

ND: Não determinado



**Figura 7.** Representação da estrutura química da molécula de cafeína (A) e do ácido clorogénico (B)

### 1.6.3 O café e as suas propriedades

Vários têm sido os estudos de toxicidade efetuados em diversos organismos, relacionados com o consumo de café. Destacam-se os efeitos nocivos no sistema nervoso (Higure & Nohmi, 2002), uma eventual sensibilização a danos no DNA (ácido desoxirribonucleico) (MacPhee & Leyden, 1985; Pons & Müller, 1989), efeitos sobre a divisão celular (La Pena, et al., 1981), no desenvolvimento de organismos (Burdan, 2003; Castellanos & Rapoport, 2002) e na fertilidade (Hewavitharanage, et al., 1999).

Contudo, a sua ação benéfica na saúde humana inclui a redução de incidência de algumas doenças degenerativas como o cancro e diabetes (Nkondjock, 2009; van Dam & Feskens, 2002), a redução de risco de doenças cardiovasculares (Andersen, et al., 2006). Estudos sugerem que a presença de compostos fenólicos no café apresentam efeitos antioxidante, anti-mutagénico, antialérgico, anti-inflamatório e antimicrobiano (Balasundram, et al., 2006; Ham, et al., 2009; Parvathy, et al., 2009). Estudos recentes confirmam, que devido a sua bioatividade antioxidante, o CGA está envolvido em vários mecanismos de ação incluindo a eliminação de radicais livres (Silva, et al., 2000).

Devido a todas estas propriedades enunciadas, tem havido nos últimos anos um aumento de interesse na valorização destes compostos fitoquímicos provenientes de resíduos de forma a ser aplicados, por exemplo na indústria cosmética, petrolífera, entre outros (Chiang, et al., 2011; Burton, et al., 2010).

### 1.6.4 Café e o seu potencial efeito inseticida

Vários têm sido os estudos direcionados ao efeito que o café e os seus derivados têm sobre os artrópodes. Em 1977, Zimmering e colaboradores, estudaram o efeito deletério da cafeína em adultos de diversas estirpes de *Drosophila melanogaster* Meigen, 1830. Tendo utilizado uma solução de cafeína como alimento para os adultos, os autores verificaram a ocorrência de diferenças significativas de mortalidade entre os insetos que se tinham alimentado de soluções de sacarose em comparação com os alimentados com cafeína e que apresentavam taxas de mortalidade mais elevadas. Sehgal et al (1977), avaliaram o efeito do café no desenvolvimento e no crescimento nas larvas de *Telmatoscopus*. Os resultados sugerem que houve um retardamento severo no desenvolvimento e uma elevada mortalidade larvar, nos insetos que estiveram em contato com este composto. Verificou-se também que as larvas que completavam o seu ciclo de vida originavam adultos com baixa fertilidade sugerindo que a cafeína também teve influência nas alterações morfológicas que ocorreram na fase adulta.

Estudos com borras de café em *Aedes aegypti*, Linnaeus, 1762 (Diptera: Culicidae) sugerem que estas têm efeito larvicida, verificando-se também um atraso no desenvolvimento das larvas para o estado adulto e uma diminuição nas taxas de oviposição destes. Nestes estudos foi também analisada a atividade enzimática das esterases através de géis de poliacrilamida, de forma a tentar perceber qual o mecanismo envolvido na metabolização daquelas substâncias. O estudo concluiu que a expressão de algumas carboxilesterases foi afetada, podendo ser este o mecanismo de ação das substâncias inseticidas presentes nas borras de café. (Guirado & Bicudo, 2007; Laranja, et al., 2003)

Verificou-se também que o café tem influência na competência vetora dos mosquitos para o vírus de La Crosse, havendo uma diminuição dos níveis de virémia quando as larvas do mosquito *Aedes albopictus* Skuse, 1894 são criadas na presença de derivados de café (Eastep, et al., 2012). Mais recentemente, foi estudada a preferência das fêmeas de *Ae. albopictus* em relação a diferentes meios para oviposição e constatou-se que o número de posturas foi muito baixo em criadouros com café. Para além do mais, as fêmeas que desenvolveram o seu ciclo de vida em ambientes com café, e que fizeram posturas nesse mesmo tipo de criadouro, obtiveram taxas de eclosão mais baixas (Satho, et al., 2015).

### 1.7 Processo de separação com membranas

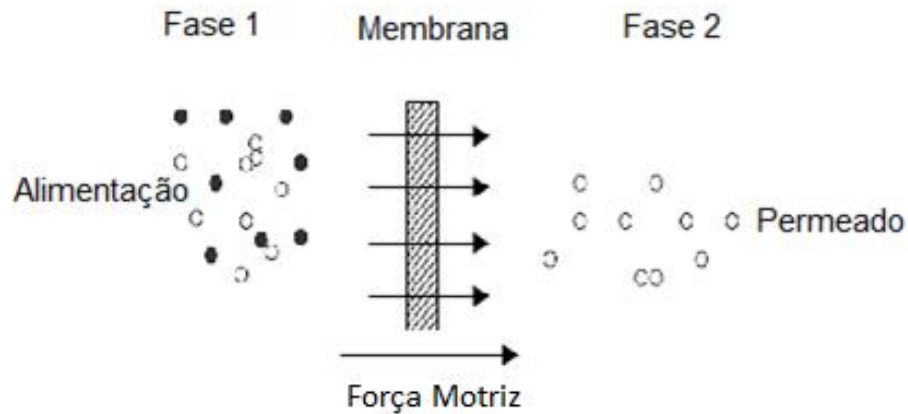
A tecnologia de membranas iniciou-se na década de 60, e, atualmente, é aplicada nas mais diversas indústrias, tais como farmacêuticas, têxteis, químicas, e essencialmente na indústria alimentar, em processos de separação/purificação e/ou concentração (Hamza, et al., 1997).

Quando comparado com as técnicas convencionais de concentração, como a evaporação, ou, com processos de separação, como técnicas de cromatografia, a tecnologia de membranas oferece um maior interesse, por: (1) apresentar qualidade no produto final mais elevada, ao remover contaminantes que podem ter um impacto negativo no produto final; (2) ter maior competitividade e valor económico, ao apresentar menos etapas de separação e consequentemente um menor consumo energético; (3) por ser um processo simples e de fácil implementação; e por último, (4) ser ambientalmente benigno (Mulder, 1996; Baker, 2004) .

#### 1.7.1 Definição de membrana

A membrana define-se como uma barreira semi-seletiva, que separa duas fases (Noble & Terry, 2005; Mulder, 1996), estando representada esquematicamente na **figura 8**. Pretende-se uma permeação seletiva de determinados compostos face a outros presentes na alimentação, com vista a uma remoção ou separação dos compostos que permeam preferencialmente a membrana. O transporte de compostos, através de determinada membrana, realiza-se devido a uma determinada força motriz entre os compartimentos adjacentes à membrana (compartimentos da alimentação e do permeado) (Mulder, 1996; Baker, 2004).

A força motriz responsável pelo transporte de espécies (compostos) nos processos com membranas usados neste trabalho foi a diferença de pressão total nos compartimentos da alimentação e do permeado.



**Figura 8.** Esquema do funcionamento de uma membrana. Adaptação de Mulder (1996)

A eficiência de um processo membranar pode ser determinada pela rejeição aparente do composto  $i$ ,  $R_i$ :

$$R_i = 1 - \frac{C_{pi}}{C_{ai}}$$

**(Equação 1)**

Onde,  $C_a$  é a concentração da espécie  $i$  na alimentação e  $C_p$  é a concentração da espécie  $i$  no permeado. A eficiência destes processos é também influenciada pelo fluxo através da membrana,  $J_p$  ( $L \cdot m^{-2} \cdot h^{-1}$ ), representada na seguinte equação:

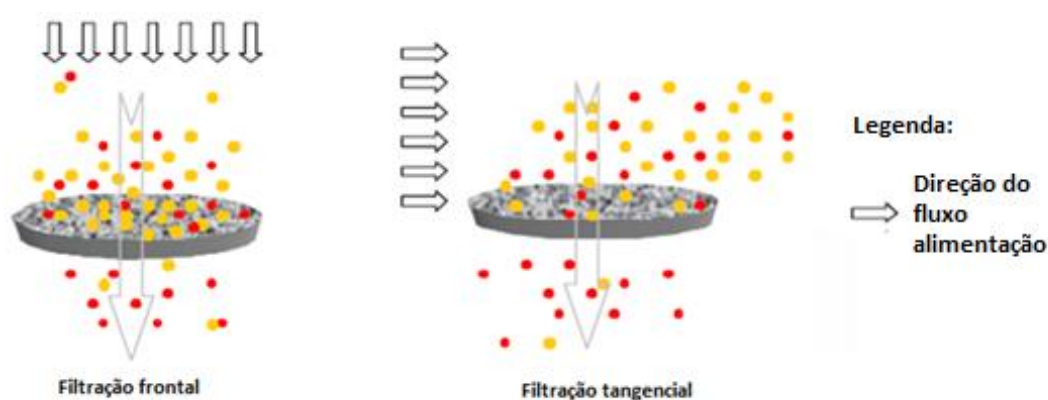
$$J_p = L_p \cdot \Delta P$$

**(Equação 2)**

Onde,  $L_p$  é a permeabilidade da membrana ( $L \cdot m^{-2} \cdot h^{-1} \cdot bar^{-1}$ ) e  $\Delta P$  pressão transmembranar (bar). A permeabilidade depende das condições de operação e das características da solução a ser filtrada; por exemplo, o aumento da temperatura aumenta o fluxo de permeado, devido à diminuição da viscosidade da solução, além de promover o aumento da difusão das espécies através da membrana. (Baker, 2004; Mulder, 1996).

### 1.7.2 Processos de separação

Os processos de separação com membranas (PSM), que têm como força motriz da separação o gradiente de pressão, podem ser realizados utilizando duas configurações distintas: (1) se o fluxo da corrente de alimentação for perpendicular à membrana a filtração é designada por filtração frontal, (2) se o fluxo da corrente da alimentação for paralelo à membrana, é denominada como filtração tangencial. Na **figura 9** estão apresentadas esquematicamente os dois modos de operação de filtração.



**Figura 9.** Representação esquemática dos diferentes modos de filtração. Adaptado de Carvalho (2008)

O tipo de filtração mais básico é a filtração frontal, onde o fluxo da alimentação é forçada a passar através da membrana, onde as partículas e/ou macromoléculas ficam retidos à superfície da membrana, formando um bolo. Este bolo vai aumentando de espessura ao longo do tempo de ensaio e a resistência à filtração vai aumentando, verificando-se uma diminuição do fluxo do permeado, caso se mantenha a pressão constante (Baker, 2004).

A filtração tangencial, ao contrário da filtração frontal, minimiza a formação da camada de bolo à superfície da membrana uma vez que o fluxo sendo tangencial à membrana provoca o transporte de partículas depositadas de volta ao seio do fluido do processo, afastando-os da membrana. Nesta operação, a alimentação desloca-se por meios hidrodinâmicos, como uma bomba, a elevadas velocidades ao longo da superfície da membrana e perpendicular ao fluxo de permeado. As substâncias de tamanho inferior ao tamanho do poro são arrastadas com o solvente, formando assim o permeado,



enquanto os solutos ou os sólidos de tamanho superior ficam retidos ou mesmo agregados na superfície da membrana, formando também o concentrado, como se esquematiza na **figura 9** (Baker, 2004; Carvalho, 2008).

### **1.7.3 Classificação das membranas**

Considerando as aplicações a que se destinam, as membranas podem ser classificadas consoante as suas características morfológicas (classificação morfológica), e segundo o tipo de material que as constitui (classificação química). A escolha das membranas a utilizar é um fator muito importante para a otimização dos processos de separação, uma vez que é necessário considerar vários fatores, tais como as interações entre as membranas e as partículas e /ou moléculas a separar, o custo de implementação e o tempo de vida útil.

#### **1.7.3.1 Classificação morfológica**

A classificação morfológica baseia-se na porosidade da membrana, no tamanho dos poros e no grau de simetria da membrana. Assim, as membranas dividem-se em porosas e não porosas. Quanto à simetria estas podem: (1) ser simétricas ou isotrópicas, onde o tamanho do poro é aproximadamente constante ao longo da espessura da membrana; ou (2) por assimétricas ou anisotrópicas quando as membranas são constituídas por camada homogénea muito fina, cuja espessura pode ir de 0.1 a 1  $\mu\text{m}$ , e por uma camada porosa com espessura de 100 a 200  $\mu\text{m}$  (Baker, 2004; Mulder, 1996).

#### **1.7.3.2 Classificação química**

As membranas têm sido construídas a partir de uma variedade de materiais, incluindo muitos polímeros sintéticos, inorgânicos ou cerâmicos e metálicos. Atualmente a maioria das membranas são produzidas a partir de diversos materiais sintéticos, tais como: polissulfonas, poliamidas, poliésteres e celulosas modificadas. Estas apresentam grande resistência a altas temperaturas e a grandes variações de pH. Uma das características importantes a ser analisada na fabricação das membranas está relacionada com o seu grau de hidrofobicidade e hidrofiliabilidade, pois quanto maior for a

hidrofilicidade de uma membrana, mais elevados serão os fluxos de permeado obtidos na filtração de soluções aquosas (Van den Berg & Smolders, 1990).

### **1.7.4 Tipos de processos com membranas**

As membranas são utilizadas em vários processos de filtração, que podem ser classificados como ultrafiltração (UF), microfiltração (MF), nanofiltração (NF) e osmose inversa (OI). A molécula é transportada através da membrana ou retida por ela, conforme a relação entre os tamanhos das moléculas e os poros da membrana, por um efeito de exclusão molecular. Assim as principais diferenças entre as membranas utilizadas nestes processos baseiam-se nos diferentes tipos de moléculas que estão envolvidas na separação, ou nos diferentes tamanhos de poro, que varia consoante os materiais usados e o seu método de fabrico (Sirkar, 1997).

Neste trabalho, em particular, foram utilizadas membranas de nanofiltração e ultrafiltração, ao qual será dado ênfase de seguida.

#### **1.7.4.1 Nanofiltração (NF)**

A nanofiltração (NF) é um processo de separação intermédio entre osmose inversa e ultrafiltração, utilizada normalmente na separação de solutos orgânicos de baixo peso molecular (200 – 1000 Da). Os mecanismos de transporte que operam neste tipo de processo são os de difusão, exclusão molecular, verificando-se também interações electrostáticas que conduzem à remoção seletiva de iões polivalentes (Baker, 2004; Mulder, 1996).

#### **1.7.4.2 Ultrafiltração (UF)**

A operação com membranas de ultrafiltração (UF) é normalmente associada à separação e concentração de macromoléculas ou partículas coloidais, utilizando membranas com microporos na ordem de 1 – 100 nm. Tendo em consideração o limite de exclusão molecular, as membranas de ultrafiltração abrangem uma gama de  $10^3$  a  $10^6$  Da (daltons). Os mecanismos de transporte que atuam geralmente neste tipo de membranas são a exclusão molecular e a difusão. Verifica-se, no entanto, que para diversos casos estes mecanismos não são os únicos a atuar, sendo a natureza da corrente

de alimentação bastante importante, visto que a presença de material coloidal conduz ao fenómeno de colmatação que altera os mecanismos da operação (Baker, 2004; Mulder, 1996).

## **2 Objetivos**

---

O controlo vetorial é uma das ferramentas mais importantes no combate à transmissão de doenças veiculadas por vetores e a formulação de novos inseticidas ou de novas abordagens de controlo vetorial são necessárias com urgência devido às elevadas taxas de resistência aos atuais inseticidas que ocorrem em diversas espécies de insetos.

Neste âmbito, o trabalho proposto têm duas vertentes: (i) primeiramente, produzir extratos naturais, com baixa carga residual, a partir de resíduos produzidos pela indústria do café, nomeadamente, da casca/polpa do fruto do café, recorrendo a técnicas de baixo custo; e (ii) analisar possíveis propriedades inseticidas desses mesmos extratos.

### **2.1 Objetivos gerais e específicos**

Assim sendo, neste trabalho foram propostos os seguintes objetivos gerais e respetivos objetivos específicos:

- (1) Obtenção de extratos brutos e frações, enriquecidos em cafeína e ácido clorogénico obtidas por processo com membranas. A concretização deste objetivo envolveu a otimização das seguintes etapas:
  - Otimização do processo de extração de compostos fenólicos a partir da casca e polpa de café, com o estudo das seguintes variantes: tempo de extração, meio de extração e temperatura.
  - Otimização do processo de fracionamento com membranas de nanofiltração e ultrafiltração dos extratos brutos obtidos;
  - Concentrar os extratos obtidos, de modo a obter melhores resultados nos ensaios de biossensibilidade;
- (2) Avaliar o efeito larvicida de compostos derivados do café utilizando extratos aquosos produzidos a partir da polpa e da casca das bagas de café com a finalidade de desenvolver, futuramente, novas estratégias de combate aos vetores transmissores de doenças aos humanos.

## ***2 Objetivos***

- Avaliar o efeito larvicida dos diferentes extratos segundo as normas e os protocolos da OMS;
- Determinar concentrações letais (LC) LC50, LC90 e LC99, dos extratos mais eficientes;

## ***3 Material e Métodos***

---

### **3.1 Materiais**

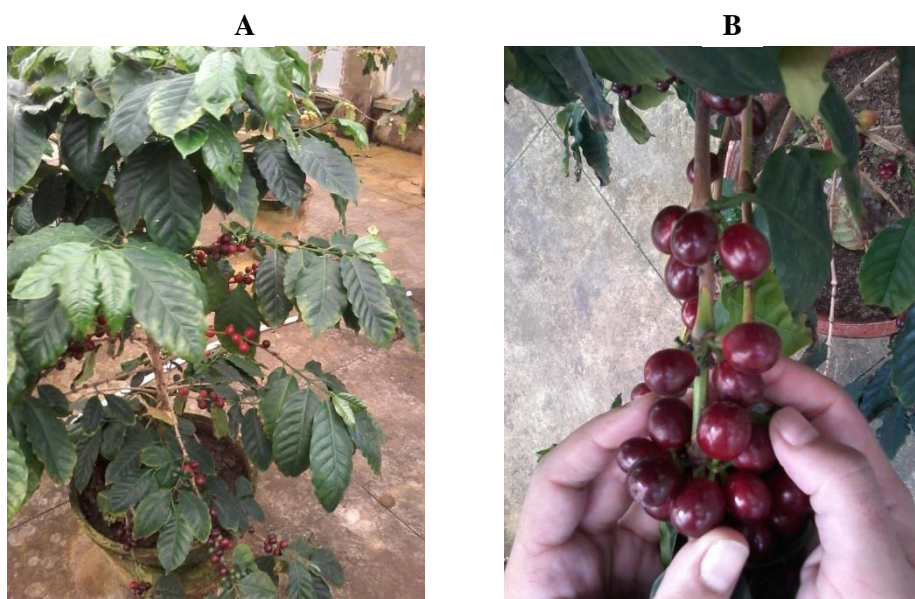
#### **3.1.1 Reagentes**

Os reagentes utilizados foram reagentes de Folin-Ciocalteu (Panreac, Folin-Ciocalteu DC), ácido cítrico (Panreac, 1-hidratado), ácido trans-ferúlico (Sigma-Aldrich,  $\geq 99\%$ ), ácido clorogénico (Sigma-Aldrich,  $\geq 95\%$ ), cafeína (Alfa Aesar, 99%), p-courâmico (Sigma-Aldrich  $\geq 98\%$ ), ácido tartárico (Tartaric Acid Natural L(+)), Metanol (HPLC Grade  $\geq 99,9$ , Sigma-Aldrich), ácido acético glacial (analytical methods, 99%, Sigma-Aldrich),

#### **3.1.2 Material biológico**

As bagas de café foram fornecidas pelo Centro de Investigação das Ferrugens do Cafeeiro/Instituto de Investigação Científica Tropical. A colheita foi feita diretamente de cafeeiros com a designação de Sarchimor, provenientes da Costa Rica, com origem num híbrido designado por CIFC H361/4 (Villa Sarchi x Híbrido de Timor CIFC 832/2). Estes cafeeiros não foram sujeitos a aplicação de inseticidas/pesticidas (Várzea V. comunicação pessoal). Após a sua colheita, foram separadas, manualmente, a casca e polpa da baga de café da sua semente. Congelaram-se as cascas/polpa a  $-20^{\circ}\text{C}$ , para processamento posterior e descartaram-se as sementes.

Como pré-tratamento, o material biológico foi seco a  $70^{\circ}\text{C}$  numa estufa durante 48h, tendo sido posteriormente moído, numa máquina de moer café, de uso doméstico.



**Figura 10.** Representação fotográfica da recolha da matéria-prima.

**A** – Fotografia de uma planta de café em estufa no CIFC/IITC. **B** – Fotografia das bagas de café utilizadas antes da colheita

### 3.1.3 Membranas

Para a otimização do processo de fracionamento com membranas foram utilizadas as membranas assimétricas abaixo tabeladas:

**Tabela 4.** Características das membranas poliméricas utilizadas.

Membrana	Tipo de membrana	Fabricante	Composição da membrana <sup>(1)</sup>	$L_p$ (water) 40°C (L/m <sup>2</sup> .h. bar) <sup>(2)</sup>	MWCO <sup>(3)</sup> (Da)	Temperatura máxima de operação °C
<b>GH</b>	Ultrafiltração	Ge Osmonics	PA - TCF	5.15	2000 <sup>(4)</sup>	50
<b>UP005</b>	Ultrafiltração	Microdyn-Nadir	PES	> 10	5000	95
<b>NP010</b>	Nanofiltração	Microdyn-Nadir	PES	5.53	1000	95

(1) PA – TCF: Poliamida *Thin-Film composite*; PES: Polietersulfona

(2)  $L_p$  - permeabilidade

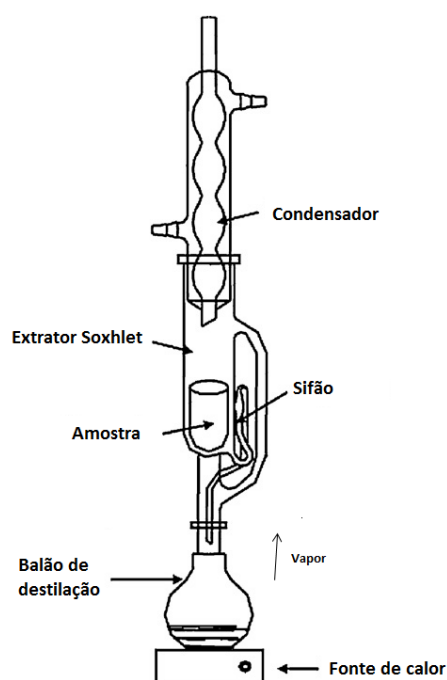
(3) MWCO (molecular weight cut-off) – limite de exclusão da massa molecular, indica-nos a massa molar dos solutos a partir da qual a rejeição é superior a 90%

(4) Em polietilenoglicol.

## 3.2 Equipamentos

### 3.2.1 Extrações

O extrator de Soxhlet, representado na **figura 11** é utilizado para extrações de amostras sólidas por um solvente. A amostra é depositada num cartucho de filtro que é colocado no interior do extrator. O extrator está ligado a um balão de destilação, contendo o solvente de extração, e a um condensador. Iniciando o aquecimento, o vapor produzido pelo solvente de extração, ao contatar o condensador, condensa e cai no extrator onde se encontra a amostra. Este vai enchendo lentamente de líquido que, quando o extrator atinge a sua capacidade, é sugado pelo sifão para o balão de condensação. O processo é repetido consecutivamente até se considerar que a extração está completa.



**Figura 11.** Ilustração da montagem de um convencional extrator Soxhlet. Adaptado de Castro (2010)

Para a obtenção de extratos em maior volume, recorreu-se a um reator de 5L com agitação contínua. A instalação de extração está representada na **figura 12**. O reator está incorporado com pás de agitação ligado a um sistema de agitação. A temperatura é mantida por um sistema de aquecimento suportado por um banho de incubação, ligado ao reator.

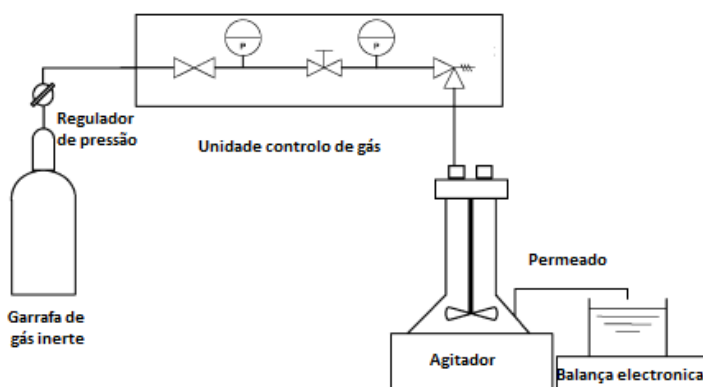




**Figura 12.** Reator utilizado na extração de resíduos de café. Sistema acoplado por um sistema de agitação. Instalações da FCT-UNL (Faculdade de Ciências e Tecnologias da Universidade Nova de Lisboa)

### 3.2.2 Instalação nano/ultrafiltração – Filtração frontal

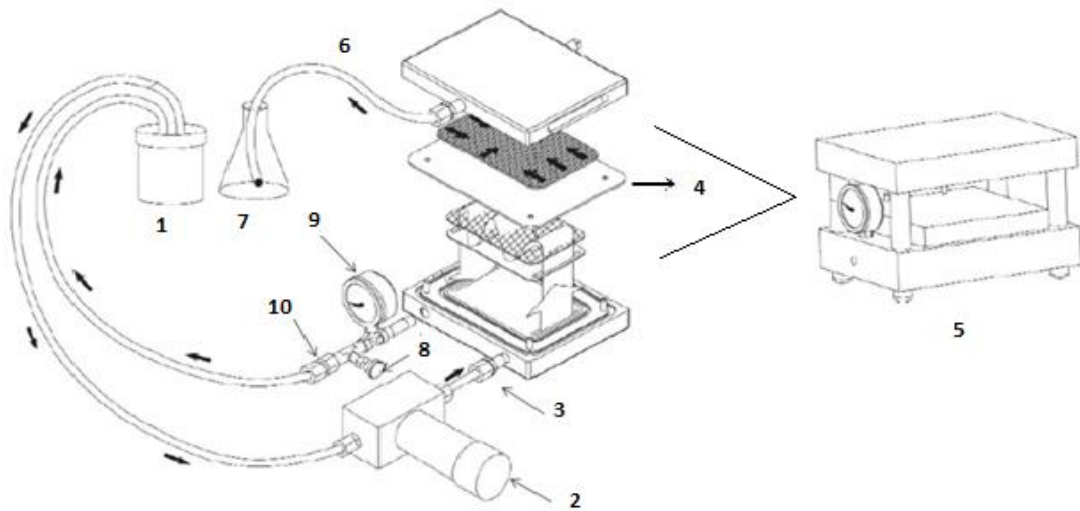
Para os ensaios que foram executados em filtração frontal ou *dead end*, recorreu-se a uma célula de teste de aço inoxidável, METCell, com uma unidade de controlo de pressão (**figura 13**), fornecida por uma garrafa de gás de argon. A membrana com uma área de  $51.4 \text{ cm}^2$  é suportada por um disco de aço inoxidável.



**Figura 13.** Configuração experimental do ensaio á escala laboratorial, modo de filtração frontal. Adaptado de Teixeira (2009).

### 3.2.3 Instalação do sistema nanofiltração/ultrafiltração – Filtração tangencial

Para os ensaios efetuados em filtração tangencial recorreu-se a instalação representada na **figura 14 e figura 15**. O equipamento é constituído por uma bomba de deslocamento, um sistema de controlo de velocidade de recirculação e de pressão, e uma célula de permeação que permite operar em nano/ultrafiltração (GeOsmonics - Sterlitech®). Como tanque de alimentação foi utilizado um frasco SCHOTT de 11L, envolvido num sistema com circulação de aquecimento (1). A pressão do sistema de circulação da alimentação foi assegurada por uma bomba (2), montada a seguir à alimentação. A alimentação entra na célula de permeação (3). Nesta célula, que está inserida num suporte (5), é colocada a membrana e ocorre todo o processamento da alimentação (4). Todos os compostos que permeia a membrana, denominado como permeado, saem da célula para um diferente compartimento ((6) e (7)). A pressão do sistema foi regulada por uma válvula que se encontra à saída da célula de permeação (8) e lida num manómetro (9). O modo de operação durante os ensaios decorreu em recircularização total, ou seja, o que não é permeado, volta a alimentação. A temperatura da alimentação foi monitorizada por um termómetro de mercúrio. A área da membrana utilizada nesta instalação é de 141 cm<sup>2</sup>.



**Figura 14.** Representação esquemática do sistema de nano/ultrafiltração, modo de filtração tangencial. Adaptado de Sterlitech Corporation, 2015.

**Legenda:** (1) – Alimentação; (2) – Bomba; (3) – Entrada da alimentação; (4) – Membrana; (5) – Suporte da célula de permeação; (6) – Saída do permeado; (7) – Permeado; (8) – Válvula de controlo de saída do concentrado ou retentado; (9) – Manómetro; (10) – Saída de concentrado ou retentado.



**Figura 15.** Instalação de nano/ultrafiltração GEOSonics. Instalações da FCT-UNL

### 3.2.4 Sistema de evaporação em rotavapor

Para evaporação dos solventes nos extratos obtidos recorreu-se a um rotavapor (Rotavapor R-200, Büchi®). O equipamento é composto por um sistema de refrigeração conectado a uma coluna de condensação (Huber-Minichiller®), a um sistema de vácuo, que permitir trabalhar a pressões inferiores à pressão atmosférica, e a um sistema de banho que mantém a temperatura da amostra constante.

## 3.3 Método experimental

### 3.3.1 Otimização do processo de extração

A otimização do processo de extração tem como objetivo obter extratos com o máximo de concentração de compostos fenólicos, que variam conforme o meio de extração, o tempo de extração,  $t_{\text{extração}}$  (h), a temperatura,  $T$  (°C), e as razões mássicas entre meio extração/resíduo, RM (-).

#### 3.3.1.1 Otimização do meio e tempo de extração

Para o estudo do meio de extração e tempo de extração,  $t_{\text{extração}}$  (h) recorreu-se ao método de Soxhlet, em que no balão de destilação de 500ml imerso num banho de óleo, foram colocados cerca de 250 g de meio extratante juntamente com um agitador magnético para uma agitação constante de cerca 400 rpm (rotações por minuto). No cartucho de filtro foram colocados cerca de 50 g de matéria-prima. A temperatura utilizada neste método foi de 100°C.

Os meios de extração estudados foram: (i) uma solução de ácido cítrico em água (WHA), aditivo alimentar com concentração de 3g/L, e (ii) água destilada (W). A razão mássica (RM) meio de extração/resíduo de café utilizada foi de 5.

A razão mássica é definida pela seguinte equação:

$$RM = \frac{m_{\text{meio extratante}} (g)}{m_{\text{resíduo (tal e qual)}} (g)^1} \quad \text{(Equação 3)}$$

<sup>1</sup> **m resíduo (tal e qual):** Massa de resíduo inicial aquando a sua colheita, antes de ser aplicado qualquer pré-tratamento e/ou armazenamento.

Os ensaios de extração em Soxhlet foram iniciados com uma duração de 5h. Posteriormente, este tempo de extração foi otimizado, de modo a maximizar o rendimento de extração e a aumentar concentrações de compostos de interesse no extrato obtido.

#### 3.3.1.2 Otimização da temperatura de extração

Para a otimização da temperatura de extração foi colocado, num balão de destilação de 500 mL, cerca de 250 g do solvente otimizado anteriormente juntamente com 50 g de matéria-prima previamente pré tratada. O balão de destilação foi imerso num banho de óleo com agitação de 400 rpm, durante o tempo de extração previamente otimizado. A razão mássica (RM) meio de extração/resíduo de café deste estudo foi de 5 e a temperatura aplicada foi de 40°C.

Todos extratos brutos obtidos foram centrifugados 2 vezes, a 7200 rpm, 20 min, 20°C (Centrifuga Avanti J-26 XPI, Beckman Coulter).

#### 3.3.1.3 Cálculo de rendimentos

Para o cálculo do rendimento de compostos fenólicos totais e identificados, extraídos foi utilizada a seguinte equação:

$$\eta_i = \frac{m_i (g)}{m_{\text{extrato líquido}} (kg)} \times \frac{m_{\text{extrato líquido}} (kg)}{m_{\text{resíduo (tal e qual)}} (kg)} = c_i \times \frac{m_{\text{extrato líquido}} (kg)}{m_{\text{resíduo (tal e qual)}} (kg)}$$

**(Equação 4)**

Onde,  $m_i$  corresponde à massa do composto i,  $m_{\text{extrato líquido}}$  corresponde à massa de extrato líquido recuperado,  $c_i$  é a concentração do composto i e  $m_{\text{resíduo}}$  é a massa do resíduo inicial aquando a sua colheita, ou seja, antes de ser aplicado qualquer pré-tratamento.

#### 3.3.2 Otimização do fracionamento com membranas

Neste estudo de fracionamento dos extratos brutos foram utilizadas 3 membranas, mencionadas na **tabela 4**. Os ensaios foram realizados em modo de filtração frontal, pelo que se recorreu ao uso da instalação MetCell. O compartimento da

alimentação suporta um volume de 250 cm<sup>3</sup> agitada a 250 rpm. A temperatura é controlada em banho-maria, tendo sido utilizada uma temperatura de 40°C e a uma pressão de 5 bar para todos os ensaios laboratoriais. Os ensaios decorreram até obter o fator de concentração, FC (-), desejado, calculado pela seguinte equação:

$$FC = \frac{m_i}{m_f}$$

**(Equação 5)**

Onde,  $m_i$  corresponde á massa inicial da alimentação e a  $m_f$  é a massa no final da alimentação. As pesagens foram feitas ao longo do ensaio numa balança até obtermos a massa final desejada para o FC em estudo.

Para cada membrana foram analisados os seguintes parâmetros: as permeabilidades ao longo do ensaio e percentagens de rejeição, para os compostos de interesse.

#### 3.3.2.1 Cálculo das rejeições dos compostos

Para avaliação da eficiência da membrana, relativamente aos compostos desejados foi estudada ao longo do ensaio a rejeição aparente,  $R$  (%), através da equação:

$$R_i = 1 - \frac{C_{i,perm}}{C_{i,alim}}$$

**(Equação 6)**

Onde,  $C_{i,perm}$  e  $C_{i,alim}$  são respetivamente a concentração do composto  $i$  no permeado e na alimentação.

A rejeição aparente é a rejeição de um determinado composto num determinado tempo  $x$ , sendo esta relacionada com a concentração dos compostos de interesse no permeado naquele tempo  $x$ . Assim, com a rejeição aparente podemos avaliar o comportamento da membrana em função do tempo do ensaio.

### 3.3.2.2 Cálculo da permeabilidade média da membrana

A permeabilidade da membrana,  $L_p$  ( $\text{L}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{bar}^{-1}\cdot\text{h}^{-1}$ ), é definida pela capacidade da membrana permitir a passagem dos compostos de interesse pelos poros, sendo calculada da seguinte forma:

$$L_p = \frac{V}{A \times P \times \Delta t}$$

(Equação 7)

Onde,  $V$  é o volume da fração permeada (L),  $A$  é a área da membrana ( $\text{m}^2$ ),  $P$  é a pressão (bar) e  $\Delta t$  é a variação do tempo (h), do instante 0 ao instante  $x$ .

Os gráficos de permeabilidade obtidos nos ensaios foram tratados por um software de ajuste, *Table Curve 2D v5.01*. Este programa foi também utilizado no cálculo do valor médio das permeabilidades em função do tempo,  $t$  (h).

### 3.3.2.3 Tratamento das membranas

Todas as membranas utilizadas pela primeira vez foram lavadas de modo a remover os conservantes que influenciam o desempenho da membrana durante os ensaios experimentais. Estes procedimentos seguem sempre as indicações fornecidas pelos fabricantes. Para a compactação das membranas foi permeada água a uma temperatura de  $40^\circ\text{C}$  e pressão de 20 bar. Este procedimento foi acompanhado pela monitorização dos valores de permeabilidade, que quando atingiam a estabilidade indicavam que a membrana estava compactada.

## 3.3.3 Produção de extratos com as condições otimizadas

### 3.3.3.1 Obtenção dos extratos brutos

Após otimização do processo de extração e consequente fracionamento, procedeu-se a uma extração em maior volume, mediante as condições otimizadas anteriormente. A RM utilizada neste estudo foi de 4.

A obtenção dos extratos brutos foi realizada num reator de 5L, com agitação contínua. Após a extração, deixou-se em repouso *overnight* para que os resíduos sólidos

de café pudessem sedimentar, facilitando assim, a separação da fase líquida da sólida. Posteriormente, a fase sólida foi prensada, com recurso a um prensador de café vulgar, de forma a obter o máximo de fase líquida possível.

À semelhança dos extratos brutos obtidos em menor escala, os extratos brutos foram centrifugados 2 vezes, a 7200 rpm, 20 min, 20°C (Centrifuga Avanti J-26 XPI, Beckman Coulter).

#### **3.3.3.2 Obtenção extratos fracionados**

Com as condições de fracionamento otimizadas, nesta etapa foram produzidas frações numa escala superior. Este procedimento decorreu em filtração tangencial na instalação GE Osmonics, a uma pressão de 7bar e temperatura constante de 40°C. O ensaio decorreu até a um fator de concentração, FC (-), 6. Os parâmetros estudados foram as rejeições dos compostos de interesse e as permeabilidades, conforme explicado anteriormente (secção 3.3.2.1 e secção 3.3.2.2, respetivamente).

#### **3.3.4 Concentração de extratos fracionados e brutos**

Os extratos obtidos foram concentrados por evaporação a vácuo no rotavapor. O objetivo do uso desta técnica foi evaporar o solvente utilizado na extração em condições de vácuo. A amostra é colocada num balão de fundo redondo conectado a um motor de rotação e mergulhado no sistema de banho. No ensaio a pressão utilizada foi de 72 mbar e a temperatura de 40°C. A velocidade de rotação utilizada no ensaio variou entre 120 a 150 rpm. Os extratos foram concentrados até um fator de concentração 2.

### **3.4 Métodos analíticos**

#### **3.4.1 Método Folin-Ciocalteu – Determinação dos fenólicos totais**

O teor dos compostos fenólicos totais foi quantificado pelo método colorimétrico de Folin-Ciocalteu, adaptado de Singleton & Rossi Jr, (1965). As amostras, retiradas ao longo dos ensaios, foram previamente diluídas numa solução matriz composta por 1% de etanol (v/v) em água. Neste método utilizou-se uma reta de calibração com concentrações a variar entre os 12 mg.L<sup>-1</sup> a 250 mg.L<sup>-1</sup> usando o ácido



clorogénico (composto fenólico presente no café) como padrão. Pipetou-se 20 µL de amostra/padrão para um tubo digestor, juntamente com 1,58 mL de água; adicionou-se 100 µL do reagente de Folin-Ciocalteu, e levou-se ao vórtex por 5 segundos para homogeneizar as amostras. De seguida juntou-se 300 µL de carbonato de sódio ( $\text{Na}_2\text{CO}_3$ ) 0,1 M. Homogenizou-se no vórtex por mais 5 segundos e colocou-se no digestor a 40°C durante 30 min, num local com pouca luminosidade. Após esse tempo, leram-se as absorvâncias no comprimento de onda de 765 nm. Todos os resultados obtidos foram expressos em equivalentes de ácido clorogénico, [CGA] eq ( $\text{mg.L}^{-1}$ ).

#### 3.4.2 Identificação e quantificação dos compostos fenólicos por HPLC

Para a identificação e posterior quantificação dos compostos fenólicos obtidos na extração e no fracionamento, foram analisadas amostras por cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC) com gradiente. O método utilizado foi adaptado de Malovaná, et al., (2001). A separação dos compostos ficou ao cargo de um equipamento de cromatografia líquida (Module Separations waters e2695, Alliance-Waters) equipado com duas bombas, um controlador de gradiente automático e um detetor PDA (*photo diode array*) (Detector Waters 2998). Para controlo e recolha de dados foi utilizado um *software* da Enpower. A separação foi realizada através da coluna analítica Nova-Pack C18 150 mm x 3.9 mm com diâmetro 4 µm, acoplada a uma pré-coluna.

Neste método foram utilizados dois eluentes; o eluente A composto por metanol-ácido acético-água, a uma razão de 10:2:88 (v/v) e; o eluente B ue é composto por metanol-ácido acético-água, a uma razão de 90:2:8 (v/v). A coluna analítica foi inicialmente equilibrada com o eluente A durante 10-15 min, até a pressão da coluna estabilizar. O método utilizado para a eluição dos compostos fenólicos foi o seguinte: eluente A a 100%, durante 10 min; 85% do eluente A e 15% do eluente B dos 10-25 min, e; 50% do eluente A e 50% do eluente B dos 25-35 min. Entre cada injeção de amostra foi feita uma lavagem à coluna, de modo a remover quaisquer vestígios da amostra anterior. A duração da lavagem foi de 15 min, em que nos primeiros 10 min passou-se na coluna 30% do eluente A e 70% do eluente B. No restante tempo foi aplicado eluente A a 100%. As condições da corrida ocorreram com um caudal de 0.5 mL/min. A temperatura da coluna foi de 30°C, com injeções de 20 µL de cada amostra.

A detecção dos picos foi feita pelo detetor PDA, na gama do ultravioleta-visível, no comprimento de onda a 280 nm e a 320 nm.

Para a determinação da concentração dos compostos fenólicos presentes nas amostras, recorreu-se a equação da reta formada entre as áreas dos picos em função da concentração dos padrões de cada composto fenólico presente.

## 3.5 Estudo do efeito larvicida dos extratos de café

### 3.5.1 Colónia de mosquitos

Nesta fase, foram realizados ensaios larvicidas, em colónias de *Anopheles gambiae*, *Anopheles atroparvus* e *Anopheles stephensi* existentes no insectário do IHMT em condições ideais de crescimento, livres de quaisquer fatores externos que possam comprometer o seu desenvolvimento e/ou ensaios.

As colónias foram mantidas a uma temperatura de  $27^{\circ}\text{C} \pm 1$  com humidade relativa de  $70\% \pm 15\%$  e fotoperíodo de 12h dia:12h noite. As larvas foram mantidas em tinas de plástico contendo água desclorada, protegidas por um tule, sendo alimentadas (dependendo da colónia), com ração 1:1 Tetramenu com Bolacha Maria triturada (*An. atroparvus*) ou alimento para peixe (Koi & Goldfish – Colour Sticks, Tropical®) (*An. gambiae* e *An. stephensi*), duas vezes ao dia, todos os dias da semana. As águas das tinas eram trocadas periodicamente de modo a mante-las limpas. As pupas eram recolhidas diariamente e colocadas numa gaiola de emergência. No dia seguinte, os adultos emergidos eram recolhidos para a gaiola “stock”. Ambas as gaiolas continham soluções de sacarose para alimentação *ad libitum* dos mosquitos. As fêmeas adultas recebiam 1 a 3 refeições sanguíneas por semana, de acordo com a espécie em causa, recorrendo-se a duas espécies de roedores fornecidos pelo biotério do IHMT: (i) exemplares fêmeas da espécie *Mus musculus*, estirpe BALB/c ou CD-1; e (ii) exemplares fêmeas da espécie *Rattus norvegicus*, estirpe Wistar. Os espécimes foram anestesiados através de uma injeção intraperitoneal de uma mistura de 1:1 de Imalgene® 1000 (Merial) e Rompun® 2% (Bayer) em volumes adequados ao peso do animal. A manipulação dos animais foi supervisionada e realizada de acordo com as normas do Conselho da Comunidade Europeia de 24 de novembro de 1986 (86/609/EEC) e legislação nacional em vigor (Decreto-lei 129/92 de 2 de junho, Portaria nº100/92 de 23 de outubro).

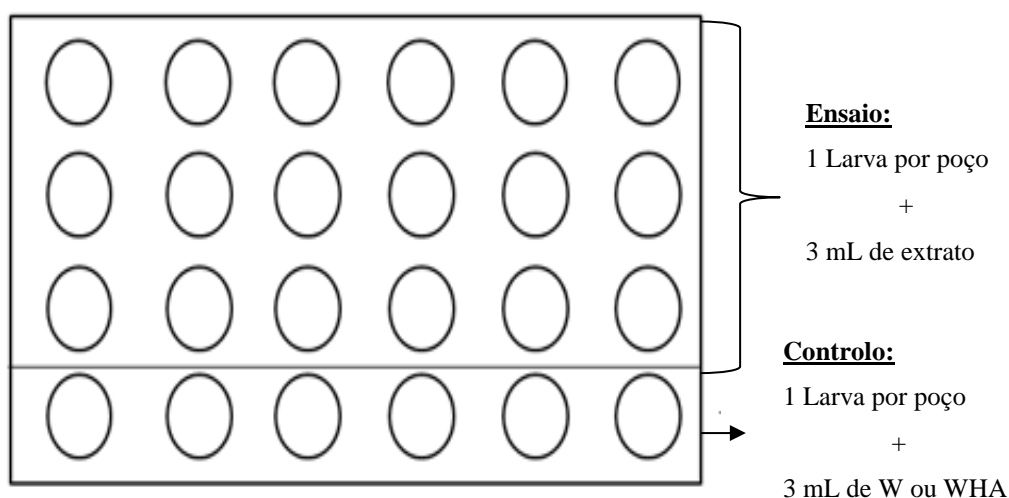
Para a oviposição, na gaiola “stock” foi colocado um pequeno recipiente de plástico com um papel de filtro dobrado em cone, coberto por água desionizada. Após a postura, os ovos recolhidos no papel de filtro foram colocados em novas tinas com água para a sua eclosão.

#### **3.5.2 Ensaios preliminares de toxicidade**

Para os ensaios preliminares de toxicidade, foram utilizados extratos de resíduos de café obtidos através de extração em Soxhlet, como anteriormente mencionado, em diferentes meios, água (W) e uma solução de ácido cítrico 3g/L em água (WHA).

A metodologia adotada encontra-se esquematizada na figura 9. Esta, apesar de seguir os protocolos padronizados pela OMS para a avaliação do efeito larvícida de novos compostos (WHO, 2005) foi efetuada em microescala. Para tal recorreu-se a placa de cultura em que em cada poço foi adicionado um volume de 3 ml de extrato/controlo e uma larva. Para cada extrato foram utilizadas no mínimo 18 larvas no teste e no controlo (**figura 17**). Nestes ensaios foram utilizadas soluções com 100% e 50% de extrato bruto. Os solventes utilizados nas extrações (água e ácido cítrico em água a 3g/L) foram utilizados nestes testes como soluções controlo. Após 24h leu-se os resultados e calculou-se a percentagem de mortalidade ocorrida.

A realização destes ensaios preliminares permitiu determinar quais os passos subsequentes para o processamento dos extratos.



**Figura 16.** Ensaio de toxicidade preliminares em *An. gambiae*, com extratos obtido em H<sub>2</sub>O (W) e ácido cítrico em H<sub>2</sub>O (WHA).

### 3.5.3 Bioensaio larvicidas

Com base nos resultados dos testes preliminares, e apenas para os extratos aquosos, testaram-se extratos brutos de resíduos de café não concentrados, designados como Extrato A e extratos fracionados não concentrados designados como Extrato B.

Numa segunda fase, foi necessário concentrar os referidos extratos, pelo que os extratos brutos e fracionados concentrados foram nomeados como Extrato C e Extrato D, respetivamente.

Na **tabela 5** encontra-se o resumo dos processos aplicados para a obtenção dos diferentes extratos.

**Tabela 5.** Tabela resumo dos diferentes extratos utilizados nos bioensaio larvicidas.

Extrato	Fracionamento	Concentração
A	Não	Não
B	Sim	Não
C	Não	Sim
D	Sim	Sim

As propriedades inseticidas dos extratos obtidos foram avaliadas através de bioensaio de atividade larvicida em *Anopheles gambiae*, *Anopheles atroparvus* e *Anopheles stephensi*, de acordo com os testes padronizados da OMS (WHO, 2005). As larvas destas espécies encontram-se instaladas no insectário, da Unidade de

Parasitologia, do Instituto de Higiene e Medicina Tropical, mantidos em salas com condições de temperatura e fotoperíodo, acima referidos.

Os testes da OMS permitem quantificar e vigiar alterações na sensibilidade aos inseticidas em populações de vetores, determinando a concentração do composto e o tempo de exposição necessários para que o inseto morra. Neste estudo optou-se por estes testes dado que pretende-se avaliar a sensibilidade dos insetos a novos produtos e se possível quantificar concentrações letais.

A atividade larvicida foi testada em larvas no estado de desenvolvimento L3-L4 que foram expostas aos extratos de resíduos de café. Os testes foram feitos em recipientes de plástico com 9,5 cm de diâmetro e 2,5 cm de altura onde foram colocadas 20 larvas, em cada recipiente. Efetuaram-se um total de cinco réplicas por extrato testado. No controlo foi utilizada água ultrapura. As condições de temperatura e humidade foram controladas e mantidas a  $27 \pm 1^\circ\text{C}$  e humidade relativa de  $75 \pm 15 \%$ . Após 24 horas de exposição, foi avaliada a mortalidade das mesmas.

A percentagem de mortalidade,  $M(\%)$  ocorrida foi calculada através da seguinte fórmula:

$$M(\%) = \frac{n^\circ \text{ de larvas mortas}}{n^\circ \text{ de larvas ensaiadas}}$$

**(Equação 8)**

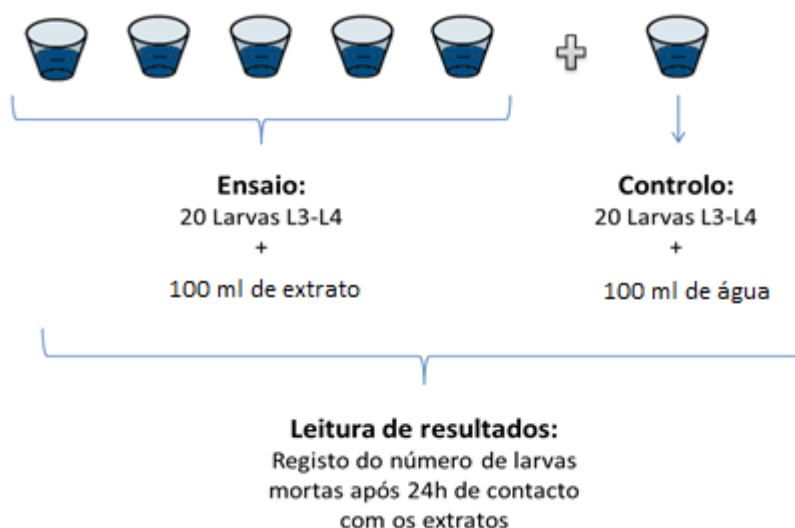
Conforme indicação da OMS, para mortalidades no Controlo entre 5% a 20% aplica-se a fórmula de Abbott, para correção das mortalidades dos grupos com tratamento:

$$\text{Fórmula Abbott } (\%) = \frac{\% \text{ sobrevivência no controlo} - \% \text{ sobrevivência no ensaio}}{\% \text{ sobrevivência no controlo}}$$

**(Equação 9)**

Em situações que as larvas passaram para o estado de pupa, os ensaios foram considerados inválidos quando a percentagem de pupas foi superior 10% das larvas testadas.

Devido à escassez de matéria-prima, por esta estar limitada a produção de café numa estufa em escala reduzida, não foi possível obter extratos em quantidades elevadas, pelo que não foi possível verificar a reprodutibilidade dos resultados para todos os extratos e espécies.



**Figura 17.** Esquema geral dos bioensaios larvicidas

#### 3.5.4 Bioensaios larvicidas com compostos padrão

O efeito larvicida de soluções modelo, com as mesmas concentrações de cafeína e de ácido clorogénico que aquelas presentes no extrato com melhor atividade inseticida, foi avaliado com a metodologia acima descrita (**ver secção 3.5.3**). Estes ensaios tiveram como objetivo avaliar se estes dois compostos seriam os únicos responsáveis pelos efeitos larvicidas observados em **3.5.3**.

#### 3.5.5 Tratamento e análise de dados

Os dados obtidos no final dos ensaios foram sujeitos a regressão *Probit* de forma a estimar as linhas de base e calcular as concentrações letais (CL) que afetam 50% (CL<sub>50</sub>), 90% (CL<sub>90</sub>) e 99% (CL<sub>99</sub>) das larvas em estudo, recorrendo ao *software* IBM SPSS Statistics v20.

Na transformação *Probit* analisa-se o logaritmo da concentração *versus* a função *Probit* da mortalidade, utilizando-se as concentrações dos extratos que produziram entre 10 e 100% de mortalidade. A análise *Probit* permite transformar uma curva dose-resposta sigmoide numa linha reta, podendo a adequação desta aos resultados observados ser analisada por meio de uma regressão de mínimos quadrados ou máxima verossimilhança (Finney 1971). O ajustamento ao modelo *Probit* foi analisado pelo teste de *Qui-quadrado de Pearson*, testando-se a hipótese nula,  $H_0$ : *o modelo ajusta-se aos resultados observados.*

## 4 Resultados

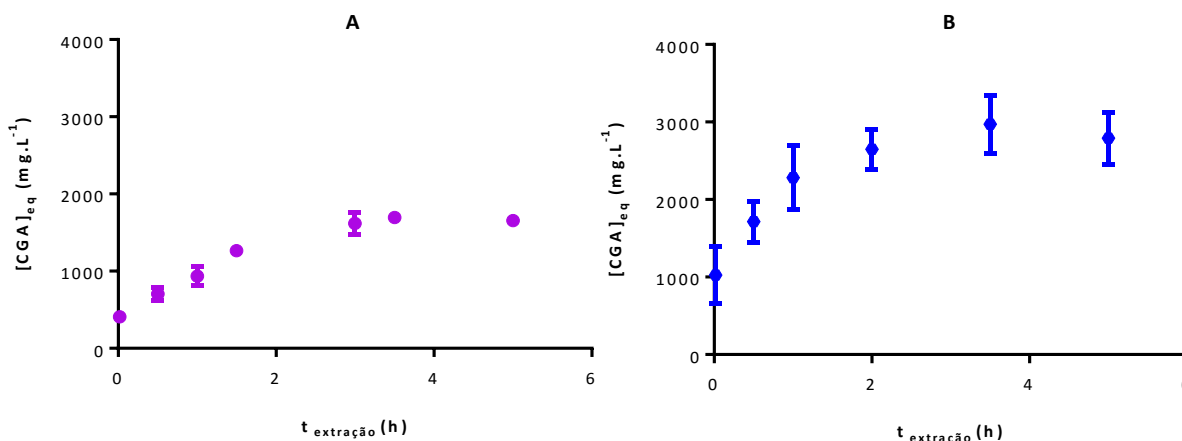
### 4.1 Extração de compostos fenólicos totais, ácido clorogénico e cafeína, a partir de casca e polpa de café

#### 4.1.1 Otimização da extração dos compostos-alvo

Avaliaram-se os efeitos dos parâmetros operacionais, temperatura,  $T$  ( $^{\circ}\text{C}$ ), razões mássicas meio extração/resíduo de café,  $\text{RM}$  (-), tempo de extração,  $t_{\text{extração}}$  (h) e composição do meio de extração, na extração de compostos fenólicos de forma a maximizar concentrações e rendimentos de cafeína e ácido clorogénico.

##### 4.1.1.1 Otimização do tempo de extração e meio de extração

Primariamente, estudou-se o tempo de extração e a eficiência de dois solventes, a água (W) e ácido cítrico (composto aditivo alimentar) em água (WHA) a uma concentração de 3g/L. Através da cinética de extração, foi possível determinar o tempo de extração necessário até atingir os valores máximos de concentração, para ambos os solventes.

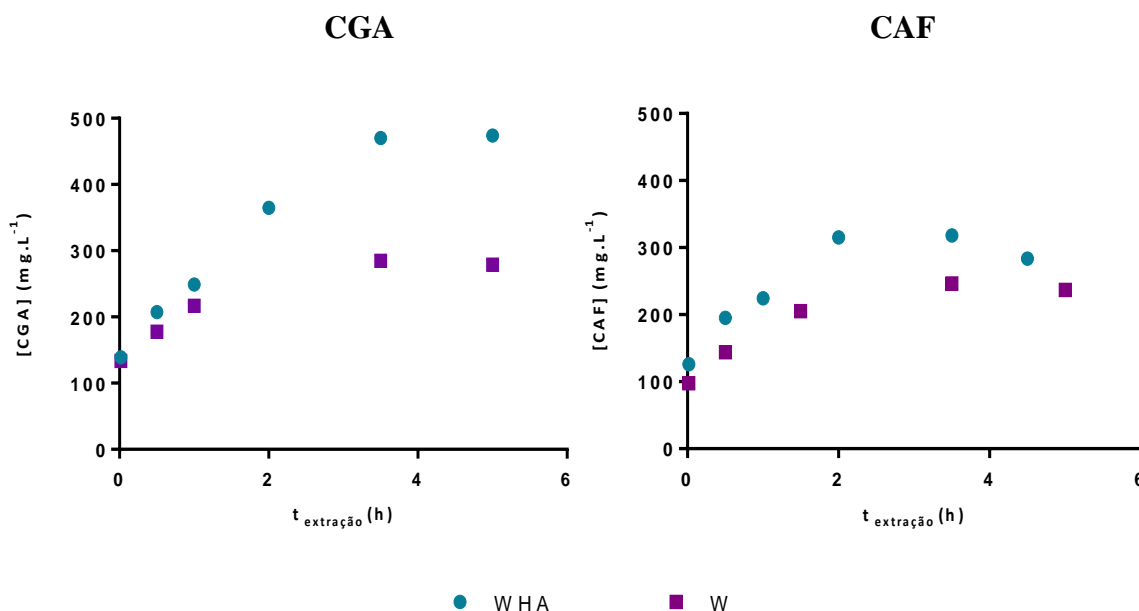


**Figura 18.** Cinética de extração de compostos fenólicos totais a temperatura de 100°C, a partir de resíduos de café sem pré-tratamento.

**Legenda:** eq.CGA – equivalentes de ácido clorogénico. **A-** Solvente de extração água (W); **B-** Solvente de extração ácido cítrico em água, concentração de 3g/L (WHA)



Pelos resultados representados na **figura 19**, concluiu-se: que (1) tempo necessário para obter concentrações máximas de compostos fenólicos totais foi de 3,5h, em ambos os solventes; e (2) o ácido cítrico em água corresponde a maiores concentrações de compostos fenólicos em comparação com o solvente água.



**Figura 19.** Cinética de extração de compostos fenólicos identificados a temperatura de 100 °C, a partir de resíduos de café sem pré-tratamento.

**Legenda:** CGA - ácido clorogénico; CAF – cafeína; WHA – solução de ácido cítrico em água à concentração de 3g/L; W – solvente água

Em ambas as extrações, identificou-se a presença de ácido clorogénico (CGA) e cafeína (CAF), em que a concentração dos mesmos foi sempre superior quando utilizado o solvente WHA. A cinética de extração para cada composto de interesse (CGA e CAF) encontra-se representada na **figura 20**.

**Tabela 6.** Concentrações de fenólicos totais em eq.CGA e compostos identificados, CAF e CGA, em g, nos referidos meios de extração.

Extração	[Fenólicos totais] em eq. CGA mg.L <sup>-1</sup>	[CGA] mg.L <sup>-1</sup>	[CAF] mg.L <sup>-1</sup>
W	1294 ± 9,5	196 ± 7	203 ± 24
WHA	2829 ± 94	470	318

**Legenda:** W – Solvente água; WHA – Solução de ácido cítrico em água, concentração de 3g/L; CGA – Ácido clorogénico; CAF – Cafeína; eq. CGA – Equivalentes de ácido clorogénico.

**Tabela 7.** Rendimento de extração de fenólicos totais, em eq. CGA, e identificados (CGA e CAF), em g, extraído a partir de 1 kg de resíduo tal e qual, a temperatura de 100°C, sem pré-tratamento, com os referidos solventes.

Extração	CGA (g/kg (resíduo))	CAF (g/kg (resíduo))	Àc. Fenólicos Totais identificados, eq. CGA (g/kg (resíduo))	Ac. Fenólicos Totais, eq. CGA (g/kg (resíduo))	% Compostos Fenólicos identificados
W	0,54 ± 0,03	0,48 ± 0,01	1,03 ± 0,03	3,51 ± 0,08	29 %
WHA	1,37	0,93	2,30	8,06 ± 0,28	29 %

**Legenda:** W – Solvente água; WHA – Solução de ácido cítrico em água, concentração de 3g/L; CGA – Ácido clorogénico; CAF – Cafeína; eq. CGA – Equivalentes de ácido clorogénico;

As **tabelas 6 e 7** mostram-nos as concentrações e os rendimentos de compostos fenólicos totais, cafeína e ácido clorogénico obtidos, no final de cada extração. Em resumo, em extrações com uma razão mássica de 5 e à temperatura de 100°C, obtiveram-se extratos com concentrações superiores quando é utilizado como meio de extração uma solução de ácido cítrico em água, em comparação com os extratos obtidos só com água.

#### 4.1.1.2 Otimização da aplicação do pré-tratamento em conjugação com a temperatura de extração

O efeito da realização ou não de um pré-tratamento na matéria-prima (envolvendo secagem e moagem) combinado com a escolha de determinada

temperatura de extração foi avaliado em termos de concentrações e rendimentos de cafeína e ácido clorogénico nos respetivos extratos obtidos.

**Tabela 8.** Concentrações de fenólicos totais em eq. CGA e compostos identificados, CAF e CGA, obtidos nas extrações à temperatura de 40°C e com pré-tratamento.

Extrato	t <sub>extração</sub> (°C)	Pré-tratamento	[Fenólicos totais] em eq. CGA mg.L <sup>-1</sup>	[CGA] mg.L <sup>-1</sup>	[CAF] mg.L <sup>-1</sup>
A	40	Secagem a 70°C, 48h e moagem	1430 ± 21	257 ± 2,4	335 ± 3,4

**Legenda:** A – Extrato obtido em água, a 40°C com pré-tratamento; CGA – ácido clorogénico; CAF – cafeína; eq. CGA – equivalentes de ácido clorogénico

**Tabela 9.** Rendimento de extração de fenólicos totais, em eq. CGA, e identificados (CGA e CAF), em g, extraído a partir de 1 kg de resíduo tal e qual, do extrato obtido a temperatura de 40°C com pré-tratamento.

Extrato	CGA (g/kg (resíduo))	CAF (g/kg (resíduo))	Ác. Fenólicos totais identificados, eq. CGA (g/kg (resíduo))	Ác. Fenólicos totais, eq. CGA (g/kg (resíduo))	% Compostos fenólicos identificados
A	0,62 ± 0,006	0,80 ± 0,008	1,42 ± 0,014	3,43 ± 0,04	41 %

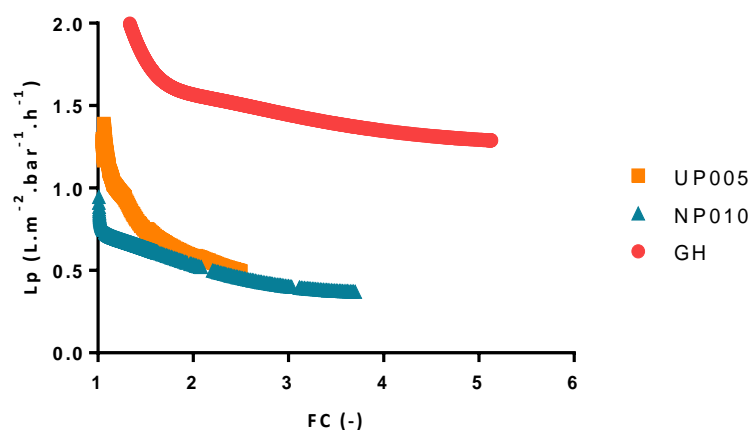
**Legenda:** A – Extrato obtido em água, a 40°C com pré-tratamento; CGA – ácido clorogénico; CAF – cafeína; eq. CGA – equivalentes de ácido clorogénico;

Pela análise dos resultados representados na **tabela 8 e 9** verifica-se que as concentrações dos compostos desejados aumentaram aquando aplicação do pré-tratamento na matéria-prima e da diminuição da temperatura de extração para 40 °C. Quando comparado com a extração em que não foi aplicado o pré-tratamento, houve uma melhoria dos rendimentos e de concentrações dos compostos de interesse, sendo este aumento mais expressivo para a cafeína (ver **secção 4.1.1.1, tabela 6 e 7**).

## 4.2 Otimização do processamento de extratos por nanofiltração/ultrafiltração

### 4.2.1 Estudo de membranas de nanofiltração e ultrafiltração em filtração frontal

Avaliou-se a eficiência de 3 membranas, uma de nanofiltração (NP010) e duas de ultrafiltração (GH e UP005), no processamento do extrato bruto produzido à temperatura de extração 100°C e sem aplicação de pré-tratamento. Escolheu-se este extrato bruto, nesta etapa particular, por este ser de mais rápida obtenção.



**Figura 20.** Permeabilidades,  $L_p$  ( $L \cdot m^{-2} \cdot bar^{-1} \cdot h^{-1}$ ), dos ensaios com as membranas NP010, UP005 e GH em função do fator de concentração, FC (-), a 5 bar e a 40°C.

**Tabela 10.** Permeabilidade médias dos ensaios de fracionamento, a 5 bar e a 40°C para cada referida membrana.

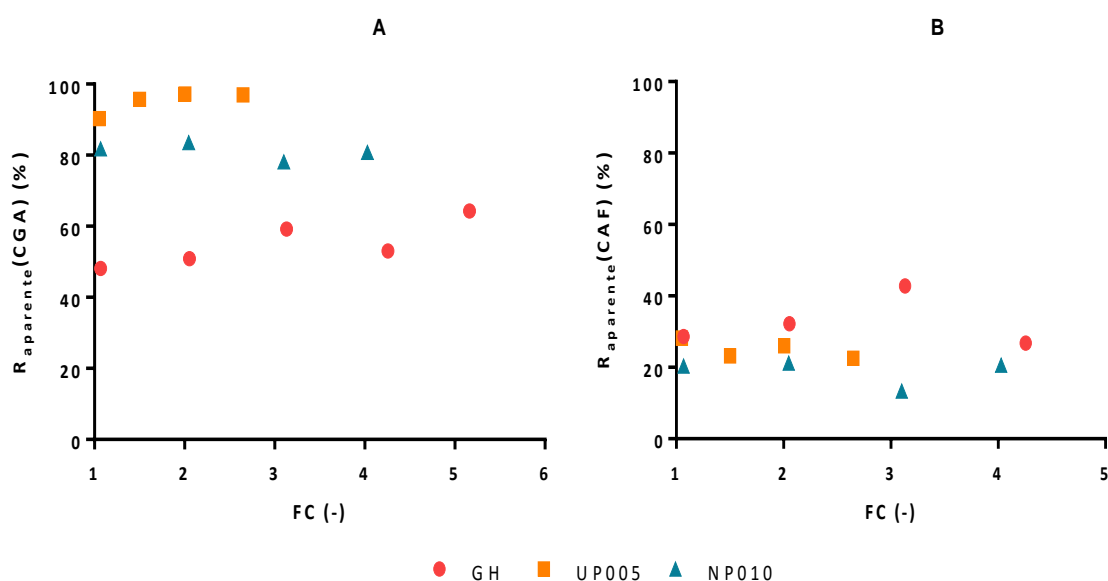
Membrana	$L_{p\text{médio}}$ ( $L \cdot m^{-2} \cdot h^{-1} \cdot bar^{-1}$ )	FC (-)
GH	1,39	5
NP010	0,53	4
UP005	0,67	2,5

**Legenda:**  $L_{p\text{médio}}$  – permeabilidade média; FC – fator de concentração

A **figura 21** mostra-nos a variação da permeabilidade de cada membrana em função do fator de concentração (FC), definido pela razão mássica entre as alimentações (ou concentrado) no início do ensaio até um certo tempo. As permeabilidades médias

foram superiores quando utilizada a membrana GH, o que torna o processo mais produtivo (**tabela 10**). Com a membrana UP005, embora esta tenha um MWCO idêntico ao da GH, observou-se que a permeabilidade obtida foi bastante inferior. A membrana NP010, que é a que têm menor MWCO, foi a que apresentou valores de permeabilidade mais baixos das três membranas estudadas.

Verificou-se no início de cada ensaio um decréscimo da permeabilidade para todas as membranas, mais acentuado quando utilizada a membrana UP005.



**Figura 21.** Rejeições aparentes dos compostos de interesse, CGA e CAF, das membranas em estudo (GH, UP005 e NP010), em função do fator de concentração.

**Legenda:** **A** - rejeição aparente do ácido clorogênico (CGA); **B** - rejeição aparente da cafeína (CAF);

**R<sub>aparente</sub> (%)** – Rejeição aparente; **FC (-)** – Fator de concentração

**Tabela 11.** Rejeições aparente dos compostos de interesse nas referidas membranas em estudo, no permeado final.

Membrana	(%) R <sub>aparente</sub> Fenólicos totais (eq. CGA)	(%) R <sub>aparente</sub> CGA	(%) R <sub>aparente</sub> CAF
NP010	74	86	29
GH	67	69	19
UP005	82	97	30

**Legenda:** **R<sub>aparente</sub>** – Rejeições aparente; **eq.CGA** – equivalentes de ácido clorogênico; **CGA** – ácido clorogênico; **CAF** – Cafeína

Na **figura 22**, estão representadas as rejeições aparentes para a cafeína e para o ácido clorogénico ao longo do ensaio de fracionamento. Verifica-se que a rejeição é sensivelmente constante em função do fator de concentração. O CGA apresenta valores de rejeição mais elevados que a CAF para todas as membranas ensaiadas, como esperado, pelo facto do peso molecular do composto CGA ser superior ao de CAF.

Na **tabela 11**, temos rejeições aparentes de compostos fenólicos totais no final do ensaio, na fração permeada final, sendo estas, as rejeições, superiores a 70% para as membranas NP010 e UP005. Pela análise das rejeições observadas, a membrana GH aparenta ser a mais eficiente, por apresentar valores de rejeição aparente de cafeína e ácido clorogénico mais baixos comparativamente às membranas NP010 e UP005. Estas membranas embora apresentem valores de rejeições aparente de cafeína idênticos, no que diz respeito ao ácido clorogénico, os valores de rejeição aparente destas são bastante elevadas, o que tornaria o nosso extrato menos enriquecido.

**Tabela 12.** Composição dos extratos obtidos, após processo de separação com membranas, de compostos fenólicos totais e de compostos fenólicos identificados (CGA e CAF).

Membranas	[Fenólicos totais] em eq. CGA (mg/L)	[CGA] (mg/L)	[CAF] (mg/L)
<b>GH</b>	918	181	194
<b>NP010</b>	365	47	153
<b>UP005</b>	403	38	173

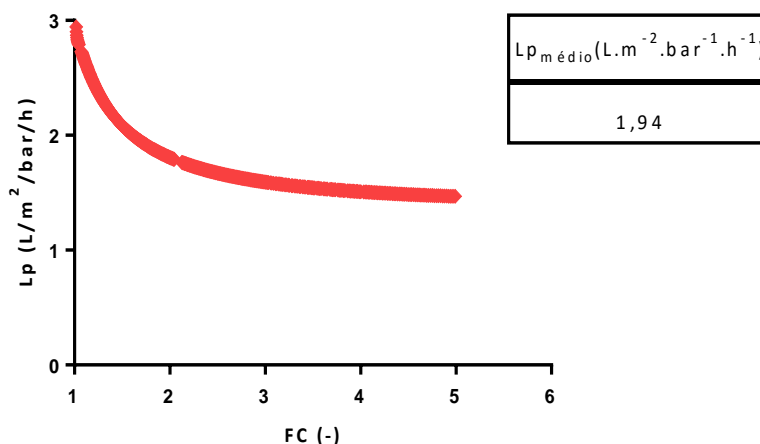
**Legenda:** CGA – ácido clorogénico; CAF – cafeína; eq. CGA – equivalentes de CGA;

Analizando a **tabela 12** onde temos as concentrações dos compostos em estudo nos vários extratos obtidos pelas diferentes membranas, podemos verificar que a membrana com maior concentração de compostos fenólicos totais e de interesse é a membrana GH.

Assim, após este estudo, concluiu-se que a membrana mais eficiente na separação dos compostos de interesse seria a membrana GH, por: (1) ser possível obter maiores concentrações de CAF e CGA; (2) ter valores de rejeição de compostos fenólicos inferiores; e (3) por apresentar valores de permeabilidade mais elevados.

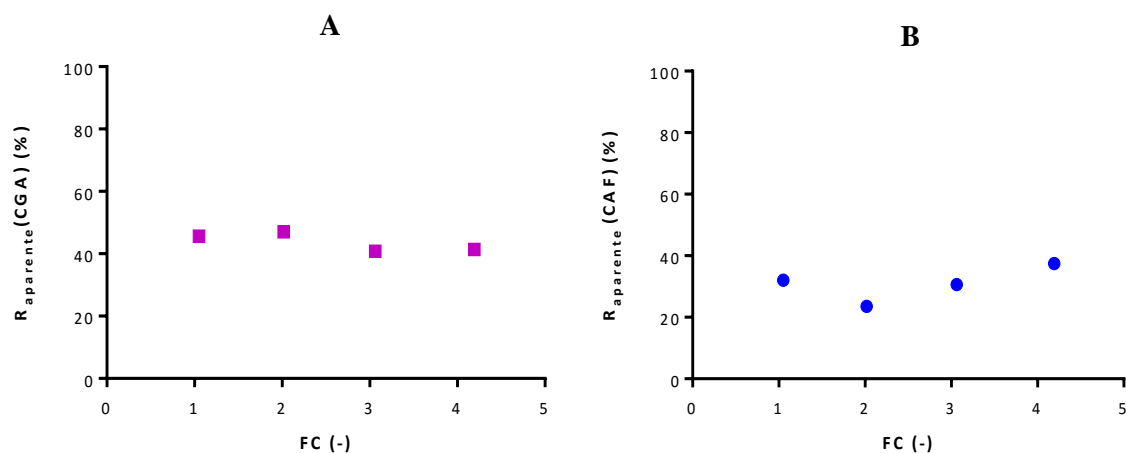
#### 4.2.2 Fracionamento do extrato bruto otimizado anteriormente recorrendo à membrana GH em modo de filtração frontal

Após a escolha da membrana a utilizar foi processado o extrato bruto obtido à temperatura de 40°C e com aplicação do pré-tratamento, em modo de filtração frontal.



**Figura 22.** Permeabilidades dos ensaios com a membrana GH em função do fator de concentração, FC (-), a 5 bar e a 40°C e respetivo valor de permeabilidade média ( $L_{p\text{ médio}}$ ).

Na **figura 23**, está representada a variação da permeabilidade em função do fator de concentração onde é visível um melhoramento da permeabilidade quando comparado com as permeabilidades obtidas anteriormente, conforme descrito na **secção 4.2.1**, **figura 20** e **tabela 10** (linha referente à membrana GH). O aumento da permeabilidade pode ser explicado pela aplicação do pré-tratamento na matéria-prima, ao reduzir camada de bolo à superfície da membrana, facilitando a transferência de massa e consequentemente o aumento do fluxo.



**Figura 23.** Rejeição aparente dos compostos de interesse nos ensaios com a membrana GH a 40°C e 5 bar em modo de filtração frontal.

**Legenda:** **A** - rejeição aparente do ácido clorogénico (CGA); **B** - rejeição aparente da cafeína (CAF);

**R<sub>aparente</sub> (%)** – Rejeição aparente; **FC (-)** – Fator de concentração

**Tabela 13.** Rejeições aparentes de compostos fenólicos totais, CGA e CAF no final do ensaio, a 5 bar e 40 °C com a membrana GH

(%) <b>R<sub>aparente</sub></b> <b>Fenólicos totais</b> <b>(eq. CGA)</b>	(%) <b>R<sub>aparente</sub></b> <b>CGA</b>	(%) <b>R<sub>aparente</sub></b> <b>CAF</b>
70	42	12

**Legenda:** **CGA** – ácido clorogénico; **CAF** – cafeína; **eq. CGA** – equivalentes de CGA; **R<sub>aparente</sub>** – Rejeição aparente

A eficiência da membrana GH no processamento dos extratos obtidos a diferentes condições (com pré-tratamento a 40°C e sem pré-tratamento a 100°C) foi analisada através dos valores das rejeições dos compostos de interesse ao longo do ensaio, apresentados na **secção 4.2.1, figura 22** (referente à membrana GH) e **figura 24**. Comparando os resultados apresentados, verifica-se um decréscimo dos valores de rejeição aparente, aquando o processamento do extrato obtido a 40°C com a aplicação do pré-tratamento. Como se pode observar na **tabela 13**, pelo cálculo das rejeições aparentes no final de cada ensaio, a rejeição de compostos fenólicos foi semelhante à obtida anteriormente quando foi utilizado extrato bruto sem pré-tratamento (ver **tabela 11, secção 4.2.1**). Contudo, no que se refere aos compostos fenólicos identificados,



CGA e CAF, a rejeição aparente diminui quando utilizado o extrato obtido a partir de matéria-prima pré-tratada.

**Tabela 14.** Composição dos extratos obtidos após fracionamento em filtração frontal, de compostos fenólicos totais, e de compostos fenólicos identificados.

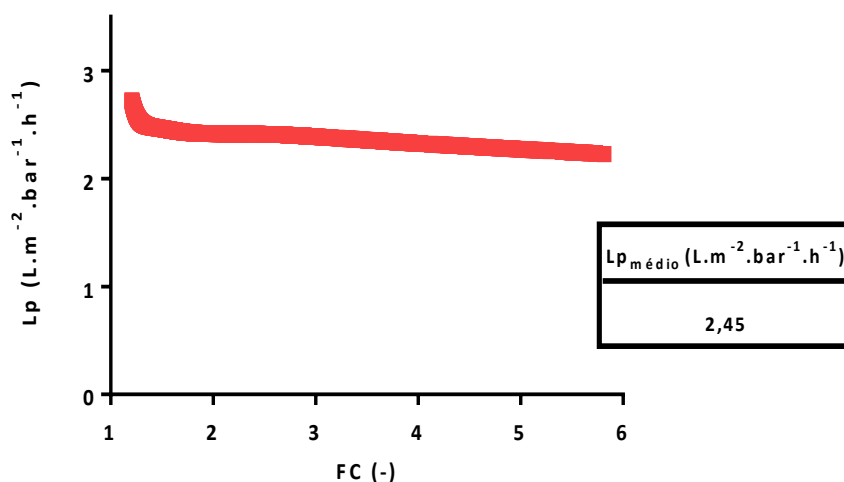
[Fenólicos totais] em eq.CGA (mg.L <sup>-1</sup> )	[CGA] (mg.L <sup>-1</sup> )	[CAF] (mg.L <sup>-1</sup> )
1239	257	291

**Legenda:** CGA – ácido clorogénico; CAF – cafeína; eq. CGA – equivalentes de CGA

Na **tabela 14**, está representada a caracterização quantitativa e qualitativa da fração permeada obtida após processo de separação com membranas do extrato produzido a partir da amostra com pré-tratamento. Por comparação com os resultados apresentados na **secção 4.2.1, tabela 12**, linha referente ao permeado obtido com a membrana GH, é notório o aumento da concentração dos compostos de interesse. Tal pode ser justificado pela diminuição de fenómenos de colmatação, que poderá ter reduzido a rejeição dos compostos de interesse, aumentando a sua concentração no permeado final.

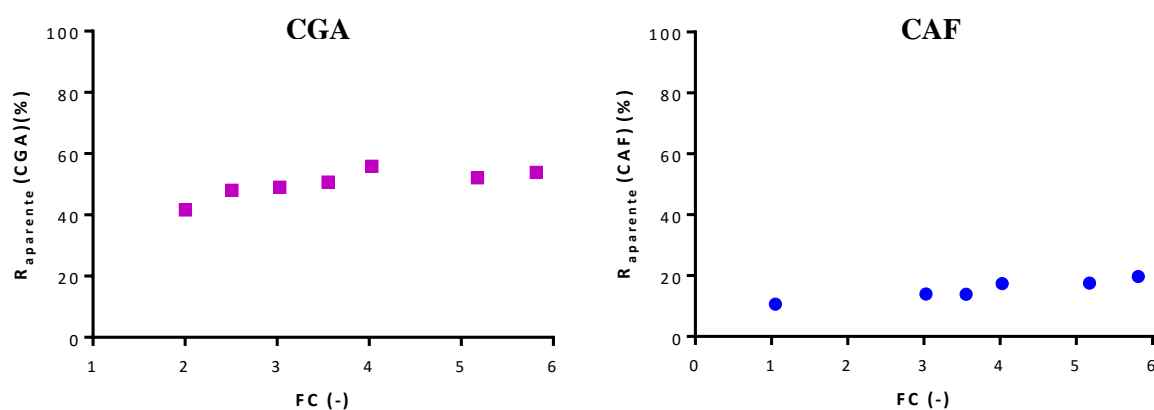
#### **4.3 Produção de extratos fracionados com condições otimizadas anteriormente em modo de filtração tangencial em escala superior**

Após otimizadas as condições operacionais para maximizar concentrações de compostos fenólicos, particularmente, cafeína e ácido clorogénico em frações de permeado, foram produzidos extratos fracionados a uma escala superior. Estes foram obtidos em modo de filtração tangencial, utilizando a membrana GH, a partir de extratos brutos obtidos a uma temperatura de extração 40°C e com aplicação do pré-tratamento.



**Figura 24.** Permeabilidades dos ensaios com a membrana GH em modo de filtração tangencial, em função do fator de concentração, FC (-) e respetivo valor médio.

Pela **figura 25**, analisando a curva de permeabilidade e o respetivo valor médio, constata-se que não existiram fenómenos de colmatção relevantes e a permeabilidade manteve-se praticamente constante ao longo de todo o ensaio, não tendo ocorrido o decréscimo de permeabilidade, como se verificou quando os ensaios foram realizados em filtração frontal. Com a aplicação de filtração tangencial observou-se, ainda, um aumento do valor médio da permeabilidade, quando comparado com os ensaios realizados em filtração frontal para esta mesma membrana (ver **secção 4.2.2**).



**Figura 25.** Rejeição aparente dos compostos de interesse nos ensaios com a membrana GH a 40°C em filtração tangencial.

**Legenda:**  $R_{\text{aparente}} (CGA) (\%)$  – Rejeição aparente do ácido clorogénico;  $R_{\text{aparente}} (CAF) (\%)$  – Rejeição aparente da cafeína; FC (-) – fator de concentração

A eficiência da membrana GH no processamento do extrato bruto foi analisada através dos valores das rejeições dos compostos de interesse ao longo do ensaio, demonstrado na **figura 26**. Comparando com o modo de operação em filtração frontal, o comportamento da membrana foi idêntico para ambos os compostos, cafeína e ácido clorogénico (ver **secção 4.2.2, figura 24**). Contudo observou-se uma diminuição dos valores de rejeição aparente para a cafeína, aquando a filtração tangencial.

**Tabela 15.** Rejeições aparentes de compostos fenólicos totais e CGA E CAF, no durante o processamento dos extratos por filtração tangencial.

(%) $R_{\text{aparente}}$ Fenólicos totais (eq. CGA)	(%) $R_{\text{aparente}}$ CGA	(%) $R_{\text{aparente}}$ CAF
60	70	24

**Legenda:**  $R_{\text{aparente}}$  – Rejeições aparente; CGA – Ácido clorogénico; CAF – Cafeína

Na **tabela 15**, estão apresentadas as rejeições aparentes, no final do ensaio na fração permeada, de compostos fenólicos totais, cafeína e do ácido clorogénico. Pela análise dos resultados e comparando com os resultados obtidos anteriormente em filtração frontal (ver **secção 4.2.2, tabela 13**), constata-se que as percentagens observadas de rejeição aparente aumentaram, nomeadamente, no que se refere ao ácido clorogénico.

**Tabela 16.** Composição dos extratos obtidos após processo de fracionamento com membranas, de compostos fenólicos totais e de compostos fenólicos.

Extrato	[Fenólicos totais] em eq. CGA mg/L	[CGA] mg/L	[CAF] mg/L
B	1412	196	224

**Legenda:** Extrato B – Extrato obtido após fracionamento com membranas; CAF – cafeína; CGA – ácido clorogénico; eq. CGA – equivalentes em ácido clorogénico

A composição do extrato fracionado obtido está representada na **tabela 16**. Comparando com os resultados anteriores, em filtração frontal (ver **secção 4.2.2, tabela 14**), observa-se um aumento das concentrações de fenólicos totais, mas uma diminuição da concentração dos compostos de interesse, nomeadamente para o ácido clorogénico.

#### 4.4 Concentração dos extratos obtidos por evaporação em rotavapor

Tendo em vista a sua aplicabilidade em bioensaios larvicidas, os extratos (bruto e fracionado) foram concentrados por evaporação a vácuo num rotavapor. Neste componente principal a evaporar será o solvente do meio de extração, neste caso específico, a água.

**Tabela 17.** Composição dos extratos obtidos após concentração por evaporação em rotavapor, de compostos fenólicos totais e de compostos fenólicos identificados.

Extrato	[CAF] (mg.L <sup>-1</sup> )	[CGA] (mg.L <sup>-1</sup> )	[Fenólicos totais] em eq.CGA (mg.L <sup>-1</sup> )
C	372	388	2727
D	359	272	2267

**Legenda:** Extrato C – Concentrações obtidas no extrato bruto após concentração; Extrato D – Concentrações obtidas no extrato fracionado após concentração; CAF – cafeína; CGA – ácido clorogénico; eq. CGA – equivalentes em ácido clorogénico

Na **tabela 17** apresenta-se a caracterização dos extratos após concentração. Embora o fator de concentração 2 seja baixo, houve um aumento ligeiro das concentrações dos compostos de interesse, cafeína e ácido clorogénico, comparando com os valores registados antes da concentração (ver **tabelas 8 e 16, secções 4.1.1.2 e 4.3**, respetivamente).

#### 4.5 Bioensaios larvicidas preliminares

Com o objetivo de aplicar os extratos anteriormente obtidos como potencial larvicida, foram efetuados diversos bioensaios com três espécies do género *Anopheles*, nomeadamente: *Anopheles gambiae*, *An. atroparvus* e *An. stephensi*.

##### 4.5.1 Ensaios de toxicidade

Este estudo de fase exploratória permitiu determinar quais os passos consequentes à otimização da extração dos compostos de interesse, pelo que foram testados dois extratos obtidos em condições diferentes: um obtido utilizando como

solvente a água e outro em que o meio de extração foi constituído por uma solução de ácido cítrico e água com a concentração de 3g/L (ver **secção 4.1.1.1, tabela 6**).

**Tabela 18.** Bioensaios de toxicidade em *An. gambiae* com os extratos obtidos com água (W) e com água+ácido cítrico 3g/L (WHA)

Extrato	Concentração (%)	Nº de larvas testadas	Mortalidade (%)	Mortalidade Abbot (%)
W	100	36	100	-
	50	36	93	-
	25	36	94	-
	0 (controlo)	18	0	-
WHA	100	36	100	Ensaio eliminado
	50	54	100	Ensaio eliminado
	25	36	94	Ensaio eliminado
	0 (controlo)	24	32	-

Na **tabela 18**, estão indicadas as mortalidades obtidas e respetiva correção, quando aplicável, das larvas da espécie *An. gambiae* quando expostas aos diferentes extratos. Dos resultados obtidos, podemos verificar que existe algum efeito nocivo dos extratos de café nas larvas, com maior relevância para os extratos obtidos com ácido cítrico. No entanto, a utilização de uma solução de ácido cítrico em água, como controlo, à concentração do solvente utilizado na obtenção do respetivo extrato, apresentou só por si um efeito larvicida tão acentuado que os valores obtidos nestes ensaios foram descartados.

#### 4.5.2 Bioensaios preliminares com extratos de café não concentrados

Neste estudo foram testados os extratos aquosos de café em bruto e fracionados, enriquecidos em compostos fenólicos. As concentrações de compostos fenólicos totais e identificados, estão representadas na **tabela 8, secção 4.1.1.2** para o extrato bruto (A) e na **tabela 16, secção 4.3** para o extrato fracionado (B).

Na **tabela 19** encontram-se os valores percentuais da mortalidade ocorrida em larvas de *An. gambiae* na presença de extrato bruto (A) e extrato fracionado (B). Embora a mortalidade tenha sido elevada quando utilizados os extratos a 100%, ou seja,

sem diluições, esta não atingiu os limiares estabelecidos pela OMS para estes extratos possam ser considerados larvicidas eficientes (WHO, 2005).

**Tabela 19.** Efeito larvicida de extratos de café não concentrados em larvas de *An. gambiae*

Extrato	Concentração	Nº de larvas testadas	Mortalidade (%)
A	100 %	300	97
B	100%	300	97
Controlo	0%	120	2,5

**Legenda:** A – Extrato bruto obtido a 40 °C com pré-tratamento; B – Extrato fracionado obtido por processos de separação com membranas a partir do extrato bruto (A).

#### 4.5.3 Bioensaios preliminares com extratos aquosos de café concentrados

De forma a melhorar os resultados anteriormente obtidos, procedeu-se à concentração dos extratos por evaporação em rotavapor, com o intuito evaporar a água existente nos extratos a um fator de concentração de 2 (ver **secção 4.4, tabela 17**).

**Tabela 20.** Efeito larvicida do extrato C em *Anopheles*

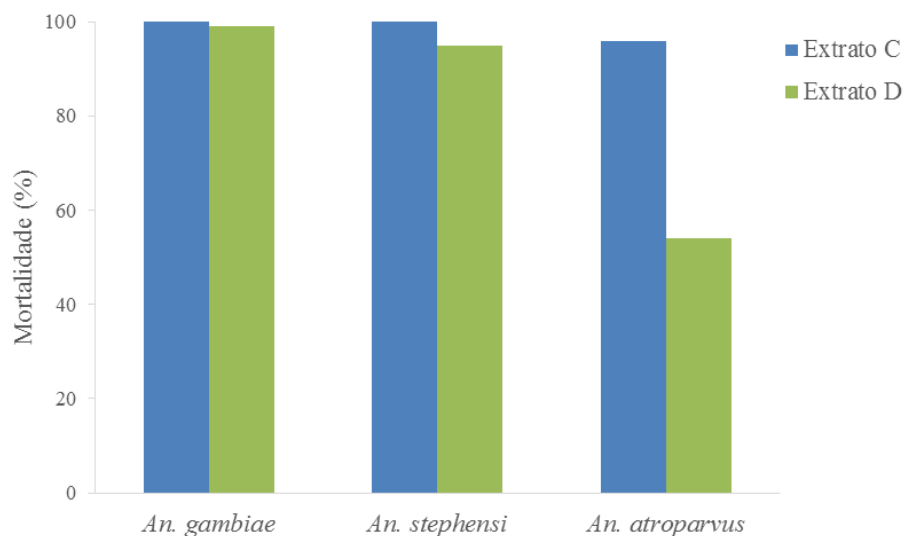
Espécie	Concentração de extrato (%)	Nº de larvas testadas	Mortalidade (%)
<i>An. gambiae</i>	100	100	100
	0 (Controlo)	20	0
<i>An. stephensi</i>	100	100	100
	0 (Controlo)	20	0
<i>An. atroparvus</i>	100	100	96
	0 (Controlo)	20	0

**Legenda:** Extrato C – extrato bruto (A) concentrado por evaporação.

**Tabela 21.** Efeito larvicida do extrato D em *Anopheles*

Espécie	Concentração de extrato (%)	Nº de larvas testadas	Mortalidade (%)
<i>An. gambiae</i>	100	100	99
	0 (Controlo)	20	0
<i>An. stephensi</i>	100	100	95
	0 (Controlo)	20	0
<i>An. atroparvus</i>	100	100	54
	0 (Controlo)	20	0

**Legenda:** Extrato D – extrato fracionado (B) concentrado por evaporação.



**Figura 26.** Representação gráfica dos resultados dos bioensaios larvicidas em *An.gambiae*, *An.atroparvus*, *An.stephensi* com extratos aquosos de café.

**Legenda:** Extrato C – Extrato bruto (A) concentrado em rotavapor. Extrato D- Extrato fracionado (B) concentrado em rotavapor.

Na **tabela 20** e **21**, estão representados os resultados dos ensaios larvicidas efetuados com três espécies de *Anopheles*, com os extratos bruto e fracionados concentrados. Destes ensaios verifica-se que o extrato bruto concentrado (C) aparenta ser um potencial larvicida contra larvas de *An. gambiae* e *An. stephensi*. Para os ensaios em que foi utilizado o extrato fracionado concentrado (D), verifica-se elevada percentagem de mortalidade para ambas as espécies que, contudo, não atingiu os 100% (**figura 27**). No caso do *An. atroparvus*, nenhum dos extratos produziu taxas de mortalidade de 100%. Ainda assim observou-se que o extrato C induziu níveis de mortalidade superiores ao extrato B.

#### 4.5.4 Bioensaios larvicidas com compostos padrão

Neste ensaio testaram-se dois compostos comerciais, cafeína e ácido clorogénico, numa solução padrão, às mesmas concentrações obtidas anteriormente para o extrato C (extrato bruto concentrado).

**Tabela 22.** Efeito larvicida da solução com compostos-padrão em *An. stephensi*.

Espécie <i>An. stephensi</i>	[CGA] (mg.L <sup>-1</sup> )	[CAF] (mg.L <sup>-1</sup> )	Nº Larvas testadas	Mortalidade (%)
Ensaio	388	372	100	68
Controlo	0	0	20	0

Legenda: CGA – ácido clorogénico; CAF – cafeína;

Pelos resultados verifica-se que mortalidade larvar obtida com os compostos padrão foi muito inferior aquela que foi observada quando se testou o extrato bruto concentrado (extrato C) nesta mesma espécie (**tabela 22**).

#### 4.5.5 Bioensaios dose-resposta do extrato bruto concentrado de resíduos de café

Este estudo de fase exploratória permitiu determinar o espectro de ação destes tipos de extratos como larvicidas, permitindo a determinação das concentrações necessárias para produzir mortalidades entre 10 e os 100%.

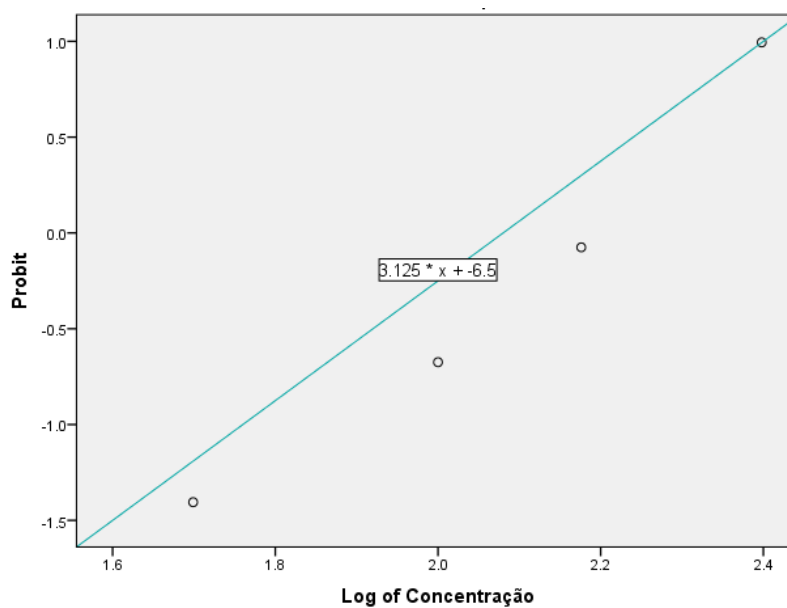
Os resultados anteriores sugerem que existe atividade larvicida do extrato bruto concentrado (C) nas espécies *An. gambiae* e *An. stephensi*, no entanto, o estudo de dose-resposta foi apenas aplicado a *An. gambiae*, devido à escassez de matéria-prima.

**Tabela 23.** Ensaio dose-resposta do extrato C em *An. gambiae*

Espécie	Concentração de extrato (%)	Concentração de extrato (g/L)	Nº de larvas testadas	Mortalidade (%)
<i>An. gambiae</i>	50%	500	100	100
	25%	250	100	84
	15%	150	100	47
	10%	100	100	25
	5%	5	100	8
	0% (Controlo)	0	120	0

Na **tabela 23** são apresentados os resultados dos ensaios efetuados, com diluições entre 5 e 50 % do extrato C. Para uma caracterização mais adequada do efeito larvicida que o extrato exerce em *An. gambiae*, os resultados obtidos foram sujeitos a análise pelo método *Probit*.





**Figura 27** Ensaio dose-resposta do extrato C em *An. gambiae* e respetiva equação da reta.

**Tabela 24.** Resultados da análise do modelo Probit para *An. gambiae* relativamente aos efeitos larvicidas dos extratos brutos concentrados.

Espécie	LC <sub>50</sub>	LC <sub>90</sub>	LC <sub>99</sub>	Equação	$\chi^2$	$\rho^*$
<i>An. gambiae</i>	<b>140</b> (111-180)	<b>310</b> (230-552)	<b>581</b> (373-1524)	Y=3,125x-6.5	7,79	0,051 <sup>a</sup>

**Legenda:**\*  $\rho < 0,05$  rejeita-se a Hipótese Nula,  $\rho > 0,05$  sugere um modelo bem ajustado, pois não se rejeita a Hipótese Nula; <sup>a</sup> para valores de significância inferiores a 0,150 um fator de heterogeneidade é utilizado para calcular os intervalos de confiança a 95%;

Na **figura 13** está representado o gráfico dose vs mortalidade obtidos nos ensaios dose-resposta OMS transformados em *Probit*, e a respetiva equação de reta.

Com base na análise *Probit* estimou-se para a espécie *An. gambiae* uma concentração letal de 50% (LC<sub>50</sub>) de 140 g/L, LC<sub>90</sub> de 310 g/L e LC<sub>99</sub> de 580 g/L de extrato bruto concentrado (**tabela 24**).

## ***5 Discussão e Conclusões***

---

O presente trabalho, como já mencionado, teve como objetivo obter, num formato económico e sustentável, extratos naturais purificados a partir de resíduos provenientes da indústria de café. Com base no estudo efetuado por Brazinha et al. (2014), onde foram otimizados processos sustentáveis na produção de extratos naturais de resíduos de café, especificamente, borras de café, recorrendo a membranas de nano/ultrafiltração, tentou-se obter extratos ricos em cafeína e ácido clorogénico, a partir da casca e polpa de bagas de café, visando a aplicação dos mesmos como larvicidas de mosquitos-vetores de doenças humanas.

### **5.1 Extração de compostos fenólicos e cafeína a partir de casca e polpa de café**

A composição de um extrato pode variar consoante as condições operacionais aplicadas, como a temperatura, o meio de extração, o tempo de extração, a razão mássica meio extração/resíduo de café e a aplicação de um pré-tratamento na matéria-prima utilizada.

Assim, para o estudo de otimização do meio e tempo de extração foi adotada a metodologia de extração por Soxhlet. Esta permite obter máximos de concentrações e rendimentos de compostos de interesse, devido aos repetidos ciclos do solvente pelo extrator, que contacta diretamente com a amostra dissolvendo os compostos solúveis naquele solvente. Adicionalmente, permite testar a termossensibilidade dos compostos de interesse a temperaturas elevadas.

O uso de compostos orgânicos, como o ácido cítrico, na extração de compostos fenólicos a partir de resíduos de café, induz um aumento das concentrações destes compostos no extrato final. A melhor performance de extração com o ácido cítrico em água deve-se ao aumento de solubilidade dos compostos fenólicos na presença deste ácido (Brazinha, et al., 2014). Sendo um composto aditivo alimentar, do ponto de vista toxicológico, o seu uso seria mais benéfico do que outro de solvente mais eficiente, mas mais prejudicial. O uso de água como solvente, embora seja menos eficaz que o ácido cítrico, pois obtivemos concentrações de cafeína e ácido clorogénico inferiores, resulta num extrato ambientalmente mais favorável e com menor carga residual.

Assim, procedeu-se a um estudo preliminar de toxicidade em larvas de *An. gambiae* com os extratos obtidos com os diferentes meios de extração. Os resultados demonstraram a existência de elevadas mortalidades no controlo, quando utilizado o extrato obtido na presença de ácido cítrico. Concluiu-se, assim, que a letalidade observada poderá ter sido devida à acidificação do meio. O enviesamento dos resultados, por ação do pH do meio, não permitiu avaliar o efeito larvicida que os extratos de café possam ter contra a espécie. Como consequência, todas as extrações subsequentes foram realizadas em água.

A escolha da razão mássica meio extração/resíduo de café (RM) 5 baseou-se num estudo de otimização das condições operacionais de extração de compostos fenólicos, a partir de borras de café, realizado por Brazinha et al. (2014). A escolha de uma RM baixa deve-se ao facto de valores mais elevados levarem a uma melhoria dos rendimentos, mas não o suficiente para compensar a diluição dos extratos. Assim, embora os rendimentos da extração sejam mais baixos, ocorre a produção de extratos mais concentrados o que representa uma importante poupança na energia necessária a uma eventual posterior concentração destes (Brazinha, et al., 2014).

Relativamente, ao parâmetro de temperatura de extração e aplicação de um pré-tratamento na matéria-prima, este estudo demonstrou que quando foram alteradas as condições de extração para temperatura de 40°C e foi aplicado o pré-tratamento, ocorreu uma melhoria nos rendimentos de extração e um aumento das concentrações dos extratos obtidos. Acresce-se que a diminuição da temperatura torna este processo de extração economicamente mais viável. Contudo, não se pode afirmar que os resultados obtidos se devem à diminuição de temperatura e/ou da introdução do pré-tratamento na matéria-prima, visto que ambas as variáveis foram alteradas, em simultâneo, no mesmo ensaio. Comparando com os estudos efetuados por Brazinha et al. (2014), a hipótese mais provável é que a melhoria dos resultados observada seja devida à aplicação do pré-tratamento, pois no estudo mencionado o aumento das concentrações dos compostos de interesse no extrato só ocorreu quando se alterou a temperatura de extração de 40°C para 100°C.

Assim, em qualquer dos casos, a composição dos extratos obtidos irá depender sempre do solvente utilizado, das condições de armazenamento e do pré-tratamento aplicado (Ramalakshmi, et al., 2009).

## **5.2 Otimização do processamento de extratos por nanofiltração/ultrafiltração à escala laboratorial**

Nesta etapa foram estudadas várias membranas para avaliar a sua eficiência no fracionamento do extrato bruto, de forma a: (1) obter extratos fracionados com concentrações de compostos fenólicos elevadas na fração permeada pela membrana, e; (2) eliminar compostos indesejáveis, de massa molecular superior, que possam eventualmente reagir com as propriedades esperadas do extrato e/ou enviar os resultados. Particularmente, pretende-se obter frações de permeado com valores de concentração maximizados de cafeína e ácido clorogénico, ou, percentagens de rejeição aparente minimizadas, utilizando membranas com permeabilidade elevada.

### **5.2.1 Estudo de membranas de nano e ultrafiltração em filtração frontal**

Os ensaios com as membranas foram realizados a uma pressão de 5 bar e temperatura de 40°C. Apesar do fluxo aumentar com o aumento da pressão utilizada, o uso de um valor baixo de pressão irá evitar que os fenómenos de colmatção na membrana aumentem, diminuindo os valores de rejeição dos compostos de interesse (cafeína e ácido clorogénico) (Brazinha, et al., 2014).

Verificou-se, pelos valores de permeabilidade obtidos em função do fator de concentração, que houve um decréscimo da permeabilidade no início do processo fracionamento para todas as membranas. Este decréscimo, mais acentuado aquando da utilização da membrana UP005 é devido a fenómenos de colmatção. Por adsorção ou deformação de compostos na membrana, ocorre um aumento de resistência no transporte de massa através desta e, consequentemente, uma diminuição da sua permeabilidade.

O material que constitui as membranas parece ser um fator determinante para explicar as diferenças de permeabilidade observadas entre elas. De facto, GH tem maior permeabilidade que a UP005, devido ao seu material ser poliamida (PA), que é mais hidrofílico que a polietérsulfona (PES), que constitui a membrana UP005. Adicionalmente, as permeabilidades das membranas UP005 e NP010 não diferem devido ao material, pois ambas são constituídas por PES, mas pelo diferente MWCO, de 5 e 9 kDa, respetivamente. Estas conclusões são igualmente sustentadas pelos trabalhos

de Brazinha et al (2014). Nestes, o fracionamento por membranas de extratos de borras de café, demonstrou que a membrana com menores rejeições de compostos de interesse (caféina e ácido clorogénico) foi a membrana de ultrafiltração GH, quando comparada com membranas de nanofiltração, como a NP010. Assim, tal como no nosso estudo, o tipo e o tamanho dos poros da membrana utilizada demonstraram ter uma elevada relevância na composição do permeado final.

O cálculo das rejeições aparentes ao longo do ensaio de fracionamento permite-nos avaliar o comportamento da membrana perante os compostos de interesse, a um determinado tempo  $x$  no ensaio de fracionamento. Constatou-se que a rejeição de caféina foi sempre inferior à rejeição de ácido clorogénico ao longo do ensaio para todas as membranas, devido à massa molecular da caféina ser inferior à do ácido clorogénico. Neste ensaio as rejeições aparente de compostos fenólicos totais demonstraram ser sempre superiores às rejeições da caféina, podendo assim concluir-se que a maioria dos compostos fenólicos presentes no extrato bruto é de massa molecular elevada, tal como foi observado por Brazinha et al (2014). A rejeição aparente, como já definido, é um parâmetro que permite relacionar as concentrações dos compostos de interesse no permeado com as concentrações dos compostos de interesse da alimentação, ou seja, permite avaliar a rejeição dos compostos de interesse no produto final e a partir daí inferir a qualidade do produto obtido. Considerando os valores de rejeições aparente obtidas nas várias membranas, em que nesta situação a fração de interesse é aquela que é permeada, é benéfico obter rejeições baixas, ou seja, para ter um extrato mais enriquecido em compostos fenólicos, inclusive os de interesse (caféina e ácido clorogénico), este devem de passar a barreira, neste caso a membrana, para o permeado. Assim, deve-se se esperar que rejeições aparentes mais baixas se reflitam em concentrações mais elevadas no extrato fracionado.

Em suma, neste estudo verificou-se que a membrana GH é a mais eficiente, por apresentar melhor permeabilidade e rejeições aparente mais baixas. Para além deste facto, a fração permeada obtida com esta membrana foi a que apresentou concentrações de caféina e ácido clorogénico mais elevadas.

### **5.3 Produção de extratos fracionados e brutos em escala superior e concentração dos mesmos por evaporação**

Com as condições de extração e fracionamento otimizadas, foram produzidos, em maior escala, extratos em bruto a partir de casca e polpa de café (previamente pré tratados) a uma temperatura de extração de 40°C, como solvente de extração a água, durante o tempo de extração 3,5h. Posteriormente, esses extratos foram fracionados, em modo de filtração tangencial, com a membrana GH, à pressão de 7,5 bar.

Na filtração tangencial o fluxo de alimentação é paralelo à membrana, ao contrário da filtração frontal, em que fluxo é contra a membrana. Tal permite reduzir os fenómenos de colmatção na membrana. Assim, pelos resultados obtidos, e, pela análise da curva de permeabilidade e o respetivo valor médio, constatou-se que não existiram fenómenos de colmatção relevantes. A permeabilidade da membrana manteve-se praticamente constante ao longo de todo o ensaio, não tendo ocorrido o decréscimo inicial, observado nos ensaios realizados em filtração frontal. Para além disso, a permeabilidade média foi bastante superior quando comparada com a obtida na filtração frontal. Tal deve-se ao melhoramento das condições hidrodinâmicas do fluido de alimentação (Brazinha, et al., 2014).

Comparando a utilização de diferentes matérias-primas, nomeadamente no que se refere a resíduos da indústria do café, utilizando a mesma metodologia, foi possível obter maiores concentrações de compostos fenólicos, particularmente, cafeína e ácido clorogénico, a partir de casca e polpa de café do que a partir de borras de café (Brazinha, et al., 2014).

Posteriormente, face aos resultados obtidos nos bioensaios larvicidas preliminares (ver **seção 5.4**) foi necessário proceder à concentração dos extratos brutos e fracionados. Para tal, os extratos foram sujeitos a uma evaporação em vácuo em rotavapor, onde foram concentrados a um fator de concentração 2, em que o solvente evaporado foi água. Em alternativa a este processo, os extratos poderiam ter sido concentrados por osmose inversa, o que tornaria o todo o processo mais favorável e com menor custos energéticos. Contudo, não foi possível adotar essa metodologia devido à escassez de matéria-prima (bagas de café) e consequentemente, de extrato bruto.

#### 5.4 Bioensaios larvicidas preliminares

Devido aos problemas associados aos inseticidas existentes, como já anteriormente referido, atualmente, os programas de controlo vetorial destacam a importância do uso de inseticidas ecologicamente seguros, de baixo impacto ambiental, economicamente viáveis e com elevados níveis de eficácia.

Desta forma foi proposto para esta etapa do trabalho, avaliar a eficácia dos extratos anteriormente obtidos com tecnologia de baixo custo como potencial larvicida de espécies de *Anopheles*.

##### 5.4.1 Ensaios de toxicidade

O propósito deste ensaio foi avaliar a eficácia dos extratos em bruto obtidos em diferentes solventes em larvas de *Anopheles gambiae*, de forma a determinar quais os passos subsequentes, como já discutido anteriormente (ver secção 5.1). Com base nestes resultados descartou-se a hipótese de se utilizar a solução de ácido cítrico em água como solvente nos processos de extração.

##### 5.4.2 Bioensaios preliminares com extratos de café não concentrados e concentrados em *Anopheles gambiae*, *Anopheles stephensi* e *Anopheles atroparvus*

Primariamente foram testados os extratos brutos e fracionados, enriquecidos em cafeína e ácido clorogénico, em larvas de *An. gambiae*. Os resultados demonstram a existência de alguma atividade larvicida, contudo, não em valores suficientemente altos para afirmar que os extratos possam ser considerados como potenciais inseticidas.

Embora os resultados obtidos nesta fase não tenham sido satisfatórios foram importantes para a decisão de efetuar uma etapa adicional de concentração de extratos.

Com os extratos concentrados foi possível obter mortalidades de 100% para as espécies *An. gambiae* e *An. stephensi* quando expostas ao extrato bruto concentrado. Assim, a utilização deste tipo de extratos obtidos a partir de casca e polpa de bagas de café parece ter efeito larvicida sobre algumas espécies de anofelíneos. Tal ação pode ser explicada pelo seguinte: sendo a casca e polpa as camadas mais externas do fruto do café, são também aquelas que estão mais vulneráveis os fatores externos, como por

exemplo a pragas de diferentes origens. Deste modo é plausível supor que estas camadas exteriores possam apresentar, na sua composição, compostos que atuam como pesticidas naturais, podendo ser um desses o responsável pelo efeito larvicida observado.

No entanto, este efeito larvicida não foi observado quando se utilizou os extratos fracionados concentrados. Esta observação poderá ser explicada por vários fatores:

(1) Aquando os bioensaios larvicidas, com extrato bruto concentrado, verificou-se que, após as 24h de ensaio, havia um depósito de resíduos no fundo das tinas de ensaio. Tendo em conta que as larvas se alimentam da matéria que existe no meio, este resultado pode sugerir que o composto larvicida poderá estar no depósito, sendo ingerido pelas larvas que não disponham de outro tipo de alimento. Esta conclusão pode ser corroborada pelo estudo de Guirado & Bicudo (2007), onde testaram o efeito larvicida de suspensões de borras de café, em que as larvas que tinham acesso ao depósito das borras de café atingiam mortalidades de 100%, em menor período de tempo, que aquelas que não tinham;

(2) Embora nos extratos fracionados a mortalidade não tenha atingido os 100%, os mesmos apresentam elevada atividade larvicida, para as duas espécies de *Anopheles*. Assim, podemos inferir que o extrato fracionado (ou qualquer composto nele existente) poderá não estar concentrado o suficiente para atingir a mortalidade desejada. Passando a exemplificar: se a presença do ácido clorogénico for essencial na atividade larvicida, o facto de este existir em menor concentração no extrato fracionado do que no extrato bruto, tal como confirmado pelos nossos resultados, pode ser o responsável pela diminuição do efeito larvicida observado;

(3) Quando foram efetuados bioensaios com a solução dos compostos de interesse (cafeína e ácido clorogénico), às mesmas concentrações que as estimadas para o extrato com melhor eficácia, extrato bruto concentrado, a mortalidade observada foi bastante inferior à do extrato bruto. Estes resultados sugerem que existe algum composto no extrato em bruto que atua em sinergia com a cafeína e com o ácido clorogénico, composto esse que poderá ter ficado retido no processo de fracionamento, não constando na fração permeada.

Para a espécie *An. atroparvus*, o extrato bruto teve mais eficácia do que o extrato fracionado, contudo, as mortalidades foram sempre inferiores à das duas espécies



anteriormente mencionadas. Este resultado pode ser justificado pelo facto desta espécie que se encontra colonizada no IHMT desde 1990 apresentar alguma resistência metabólica a inseticidas (Sousa C.A., comunicação pessoal), o que poderá ter enviesando os resultados. No entanto, sabe-se que a performance fisiológica varia consoante as espécies e este resultado pode apenas indicar que os extratos não têm efeito larvicida tão acentuado nesta espécie.

### 5.5 Bioensaios dose-resposta do extrato de resíduos de café em bruto e concentrado

Nos bioensaios dose-resposta, foi determinado as concentrações letais do extrato C (bruto e concentrado), para a espécie *An. gambiae*. Este ensaio foi apenas realizado para esta espécie devido à falta de matéria-prima, tendo sido efetuado apenas uma réplica, pelo que será considerado um ensaio preliminar. Assim não foi possível comparar este resultado entre as espécies em estudo, nem com outros trabalhos similares. Na realidade, não foram encontrados muitos trabalhos similares embora o efeito tóxico da cafeína tenha sido avaliado em ensaios realizados por Nigsch e colaboradores, 1977. Estes autores, estudando estirpes de *Drosophila*, obtiveram LC50 para fêmeas de  $2,44 \times 10^{-5}$  M (4,71 mg.L<sup>-1</sup>) de cafeína e um LC50 para machos de  $2,47 \times 10^{-5}$  M (4,77 mg.L<sup>-1</sup>) de cafeína (Nigsch, et al., 1977), inferiores aos valores obtidos no presente trabalho.

### 5.6 Considerações finais

A prevenção e combate das doenças transmitidas por vetores englobam um conjunto de medidas de controlo vetorial, tais como controlo larvicida, adulticida e medidas de proteção individual.

Assim, considerando a necessidade de investir na pesquisa de novas medidas de controlo vetorial, inclusive a formulação de novos inseticidas, foi proposto para este trabalho desenvolver um novo inseticida a partir de resíduos de indústria agroalimentar, que face aos convencionais inseticidas, seja de produção de baixo-custo, baixa carga residual e principalmente que não promova o desenvolvimento de resistências.

Na primeira parte do trabalho, foram otimizadas concentrações e rendimentos máximos de extratos de casca e polpa de café, em extratos brutos e fracionados, no qual

se concluiu que uma extração na presença do ácido cítrico aumenta a solubilidade dos compostos, contudo num ponto de vista de aplicabilidade do produto em bioensaios larvicidas não é favorável o seu uso.

O fracionamento dos extratos brutos permite a obtenção de frações mais puras e enriquecidas em compostos de interesse, o que do ponto de vista ecológico será mais favorável pois permite que moléculas potencialmente prejudiciais para o meio ambiente e de elevada toxicidade sejam rejeitadas. Contudo, e tendo em conta o objetivo final, o melhor extrato foi o bruto, por possivelmente, por apresentar um composto que atua em sinergia com a cafeína e o ácido clorogénico.

O processo de concentração dos extratos foi determinante para a obtenção dos resultados finais. Com o extrato fracionado concentrado as mortalidades obtidas, foram superiores, contudo não foram atingidos os 100% de mortalidade, pelo que um aumento no fator de concentração poderá resolver o resultado obtido.

Deste estudo podemos afirmar que existe um potencial efeito larvicida dos extratos de resíduos de café em algumas espécies de *Anopheles*, contudo não foi possível determinar se esse efeito se deve à presença apenas dos compostos fenólicos ou se de um outro composto presente.

Assim, futuramente: (1) seria importante fazer uma caracterização mais pormenorizada dos extratos obtidos, quantitativamente e qualitativamente; (2) aplicar os ensaios dose-resposta a outras espécies do mesmo género e de géneros diferentes, de forma a compreender melhor o modo de atuação destes extratos e por consequente determinar as respetivas concentrações letais; (3) avaliar o efeito inseticida destes extratos nas formas adultas; (4) e analisar eventual interferência nas restantes etapas do ciclo de vida das larvas que sujeitas a doses subletais sobrevivam ao período larvar.

Por uma questão de coerência dos resultados, seria também imprescindível estudar a reprodutibilidade dos resultados, conforme as indicações da OMS.

Por fim, é de salientar a originalidade do projeto, tendo em conta, que a metodologia adotada na fase de produção de extratos a partir dos resíduos de café terá sido aplicada apenas em borras de café, por Brazinha, (2014). Para os bioensaios larvicidas com esta matéria-prima, casca e polpa de café, não foram encontrados estudos na literatura.

## 6 Referências Bibliográficas

---

- Almeida, P. G., 2011. Os mosquitos (Diptera: Culicidae) e a sua importância médica em Portugal. Desafio para o Século XXI. *Acta médica portuguesa*, pp. 24(6), 961-974.
- Amer, A. & Mehlhorn, H., 2006. Larvicidal effects of various essential oils against *Aedes*, *Anopheles* and *Culex* larvae (Diptera, Culicidae). *Parasitology Research*, Volume 99, pp. 466-472.
- Andersen, L. F., Jacobs Jr, D. R., Carlsen, M. H. & Blomhoff, R., 2006. Consumption of coffee is associated with reduced risk of death attributed to inflammatory and cardiovascular diseases in the Iowa Women's Health Study. *The American Journal of Clinical Nutrition*, 83(5), pp. 1039-1046.
- Antonio-Nkondjio, C., Fossog, B. T., Ndo, C., Djantio, B. M., Togouet, S. Z., Awono-Ambene, P. & Ranson, H., 2011. *Anopheles gambiae* distribution and insecticide resistance in the cities of Douala and Yaoundé (Cameroon): influence of urban agriculture and pollution. *Malaria Journal*, Volume 10, p. 154.
- Baker, R. W., 2004. *Membrane Technology and Applications*. Second ed. England: John Wiley & Sons, Ltd.
- Balasundram, N., Sundram, K. & Samman, S., 2006. Phenolic compounds in plants and agri-industrial by-products: antioxidant activity, occurrence, and potential uses. *Food Chemistry*, Volume 99, p. 191–203.
- Becker, N., Petric, D., Zgomba, M., Boase, C., Madon, M., Christine, D. & Kaiser, A., 2003. *Mosquitoes and Their Control*. New York, USA: Kluwer Academic/Plenum Publishers.
- Beier, J. C., Keating, J., Githure, J. I., Macdonald, M. B., Impoinvil, D. E. & Novak, R. J., 2008. Integrated vector management for malaria control. *Malaria journal*.
- Belitz, H. D., Grosh, W. & Schieberle, P., 2009. Coffee, Tea, Cocoa. Em: *Food Chemistry*. Second ed. Garching, Germany: Springer Berlin Heidelberg, pp. 938 - 951.
- Benelli, G., Flamini, G., Giulia, F. G., Cioni, P. L. & Conti, B., 2012. Larvicidal and repellent activity of the essential oil of *Coriandrum sativum* L. (Apiaceae) fruits

- against the filariasis vetor *Aedes albopictus* Skuse (Diptera: Culicidae). *Parasitology Research*, pp. 3246-6.
- Braga, I. A. & Valle, D., 2007. *Aedes aegypti*: insecticidas, mecanismo de ação e resistência. *Epidemiologia e Serviços de Saúde*, 16(4), pp. 279-293.
- Brand, D., Pandey, A., Roussos, S. & Soccol, C. R., 2000. Biological detoxification of coffee husk by filamentous fungi using a solid state fermentation system. *Enzyme and Microbial Technology*, Volume 27, p. 127–133.
- Brazinha, C., Cadima, M. & Crespo, J. G., 2014. Valorisation of spent coffee through membrane processing. *Journal of Food Engineering*, Volume 149, p. 123–130.
- Brogdon, W. C. & McAllister, J. C., 1998. Insecticide Resistance and Vector. *Emerging Infectious Diseases*, 4(4), p. 605–613.
- Burdan, F., 2003. Intrauterine growth retardation and lack of teratogenic effects of prenatal exposure to the combination of paracetamol and caffeine in Wistar rats. *Reproductive Toxicology*, Volume 17, pp. 51-58.
- Burton, R., Fan, X. & Austic, G., 2010. Evaluation of Two-Step Reaction and Enzyme Catalysis Approaches for Biodiesel Production from Spent Coffee Grounds. *International Journal of Green Energy*, 7(5), pp. 530-536.
- Carvalho, J. M., 2008. *Recuperação de Ácido Láctico por Filtração Tangencial. Tese de Mestrado*. Lisboa: Instituto Superior Técnico.
- Castellanos, F. X. & Rapoport, J. L., 2002. Effects of caffeine on development and behavior in infancy and childhood: a review of the published literature. *Food and Chemical Toxicology*, Volume 40, pp. 1235-1242.
- Castro, M. D. & Priego-Capote, F., 2010. Soxhlet extraction: Past and present panacea. *Journal of Chromatography A*, 1217(16), p. 2383–2389.
- Chiang, H. M., Lin, T. J., Chiu, C. Y., Chang, C. W., Hsu, K. C., Fan, P. C. & Wen, K. C., 2011. *Coffea arabica* extract and its constituents prevent photoaging by suppressing MMPs expression and MAP kinase pathway. *Food and Chemical Toxicology*, Volume 49, pp. 309-318.
- Clifford, M. N. & Ramirez-Martinez, J. R., 1991. Tannins in wet-processed coffee beans and coffee pulp. *Food Chemistry*, 40(2), p. 191–200.

- Clifford, M. N., Williams, T. & Bridson, D., 1989. Clorogenic acids and caffeine as possible taxonomic criteria in *Coffea* and *Psilanthus*. *Phytochemistry*, Volume 28, pp. 829-838.
- Coleman, M. & Hemingway, J., 2007. Insecticide resistance monitoring and evaluation in disease transmitting mosquitoes. *Journal of Pesticide Science*, 32(2), pp. 69-76.
- Colmenares, N. G., Ramírez-Martínez, J. O. A. & Clifford, M. N., 1994. Analysis of proanthocyanidins in coffee pulp. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 65(2), p. 157–162.
- Cruz, R., Cardoso, M. M., Fernandes, L., Oliveira, M., Mendes Eulália, Baptista, P., Morais, S. & Casal, S., 2012. Espresso Coffee Residues: A Valuable Source of Unextracted Compounds. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 60(32), pp. 7777-7784.
- Daglia, M., Papetti, A., Gregotti, C., Berte, F. & Gazzani, G., 2000. In vitro antioxidant and ex vivo protective activities of green and roasted coffee. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, Volume 48, pp. 1449-1454.
- Djadjid, N. D., Barjesteh, H., Raeisi, A., Hassanzahi, A. & Zakeri, S., 2006. Identification, Sequence Analysis, and Comparative Study on GSTe2 Insecticide Resistance Gene in Three Main World Malaria Vectors: *Anopheles stephensi*, *Anopheles culicifacies*, and *Anopheles fluviatilis*. *Journal of Medical Entomology*, 43(6), pp. 1171-1177.
- Eastep, N. E., Albert, R. E. & Anderson, J. R., 2012. Modulation of La Crosse Virus Infection in *Aedes albopictus* Mosquitoes Following Larval Exposure to Coffee Extracts. *Frontiers Physiology*, Volume 3, p. 66.
- Esquivel, P. & Jimenéz, V., 2012. Functional properties of coffee and coffee by-products. *Food Research International*, 46(2), p. 488–495.
- Finney, D. J., 1971. *Probit Analysis*. 3rd ed. Cambridge, UK: Cambridge University Press.
- Forattini, O. P., 2002. *Culicideologia Médica*. São Paulo: EDUSP.
- Freedman, N. D., Park, Y., Abnet, C. C., Hollenbeck, A. R. & Sinha, R., 2012. Association of coffee drinking with total and cause-specific mortality. *The New England Journal of Medicine*, Volume 366, pp. 1891-1904.

- Giatropoulos, A., Papachristos, D. P., Kimbaris, A., Koliopoulos, G., Polissiou, M. P., Emmanouel, N. & Michaelakis, A., 2012. Evaluation of bioefficacy of three Citrus essential oils against the dengue vector *Aedes albopictus* (Diptera: Culicidae) in correlation to their components enantiomeric distribution. *Parasitology Research*, 111(6), pp. 2253-2263.
- Gordon, R. M. & Lavoipierre, M. M., 1962. *Entomology for Students of Medicine*. Oxford: Blackwell Scientific Publications.
- Grayer, R. J. & Kokubun, T., 2001. Plant fungal interactions: the search for phytoalexins and other antifungal compounds from higher plants. *Phytochemistry*, 56(3), pp. 253-263.
- Gubler, D. J., 1998. Ressurgent Vector-Borne Disease as Global Health Problem. *Infectious Diseases*, Volume 4, pp. 442-450.
- Guirado, M. M. & Bicudo, H. E. M. C., 2007. Effect of Used Coffee Grounds on Larval Mortality of *Aedes aegypti* L. (Diptera: Culicidae): Suspension Concentration and Age versus Efficacy. *BioAssay*, 2(5).
- Ham, S. S., Kim, S. H., Moon, S. Y., Chung, M. J., Cui, B. C., & Han, E. K., 2009. Antimutagenic effects of subfractions of Chaga mushroom (*Inonotus obliquus*) extract. *Mutation Research - Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*, Volume 672, p. 55–59.
- Hamza, A., Pham, V. A., Matsuura, T. & Santerre, J. P., 1997. Development of membranes with low surface energy to reduce the fouling in ultrafiltration applications. *Journal of Membrane Science* 131, pp. 217-227.
- Hemingway, J., 1982. Genetics of Organophosphate and Carbamate Resistance in *Anopheles atroparvus* (Diptera: Culicidae). *Journal of Economic Entomology*, 75(6), pp. 1055-1058.
- Hemingway, J. & Ranson, H., 2000. Insecticide resistance in insect vectors of human disease. *Annual review of entomology*, pp. 371-391.
- Hewavitharanage , P., Karunaratne , S. & Kumar , K. S., 1999. Effect of caffeine on shot-hole borer beetle (*Xyleborus fornicatus*) of tea (*Camellia sinensis*). *Phytochemistry* , Volume 51, pp. 35-41.

- Higure, Y. & Nohmi, M., 2002. Repetitive application of caffeine sensitizes caffeine-induced  $\text{Ca}^{2+}$  release in bullfrog sympathetic ganglion neurons. *Brain Research*, 954(1), p. 141–150.
- Howe, G. A. & Jander, G., 2008 . Plant Immunity to Insect Herbivores. *Annual Review of Plant Biology*, Volume 59, pp. 41-66.
- Hunt, R. H., Fuseini, G., Knowles, S., Stiles-Ocran, J., Verster, R., Kaiser, M. L., Cho, S.K., Koekemoer, L. L., & Coetzee, M., 2011. Insecticide resistance in malaria vector mosquitoes. *Parasites & Vectors*, Volume 4, p. 107.
- ICO, 2015. *Trade Statistics Table*. [Online]  
Available at: <http://www.ico.org/prices/m1-exports.pdf>
- Kanza, J. P., Fahime, E. E., Alaoui, S., Essassi , E. M., Brooke, B., Malafu, N. A., & Tezzo, F. W., 2013. Pyrethroid, DDT and malathion resistance in the malaria vector *Anopheles gambiae* from the Democratic Republic of Congo. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, Volume 107, pp. 8-14.
- Koshiro , Y., Zheng , X.-Q., Wang , M.-L., Nagai , C., & Ashihara , H., 2006. Changes in content and biosynthetic activity of caffeine and trigonelline during growth and ripening of *Coffea arabica* and *Coffea canephora* fruits. *Plant Science*, 171(2), p. 242–250.
- Kumar, S., Singh, A. P., Nair, G., Batra, S., Seth, A., Wahab, N., & Warikoo, R., 2011. Impact of *Parthenium hysterophorus* leaf extracts on the fecundity, fertility and behavioural response of *Aedes aegypti* L.. *Parasitology Research*, Volume 108, p. 853–859.
- La Pena, A., Puertas, M. & Merino, F., 1981. Bimeiosis induced by caffeine. *Cromosoma*, 83(2), pp. 241-248.
- Laranja, A. T., Manzatto, A. J. & Bicudo, H. E. M. d. C., 2003. Effects of caffeine and used coffee grounds on biological features of *Aedes aegypti* (Diptera, Culicidae) and their possible use in alternative control. *Genetics and Molecular Biology*, 26(4), pp. 1415-4757.
- MacPhee , D. G. & Leyden , M. F., 1985. Effects of caffeine on ultraviolet-induced base-pair substitution and frameshift mutagenesis in *Salmonella*. *Mutation Research Letters*, 143(1-2), pp. 1-3.

- Malovaná, S., García Montelongo, F., Pérez, J. P. & Rodríguez-Delgado, M. A., 2001. Optimisation of sample preparation for the determination of trans-resveratrol and other polyphenolic compounds in wines by high performance liquid chromatography. *Analytica Chimica Acta*, Volume 428, pp. 245-253.
- Marquadt, W. C., 2010. *Biology of Disease Vectors (Second Ed.)*. Amsterdam: Academic Press.
- Mosna, E., Palmieri, C., Ascher, K. R., Rivocecchi, L., & Neri, I., 1959. STUDIES ON INSECTICIDE-RESISTANT ANOPHELINES Chromosome Arrangements in Laboratory-Developed DDT-Resistant Strains of *Anopheles atroparvus*. *Bulletin of World Health Organization*, Volume 20, pp. 63-74.
- Mulder, M., 1996. *Basic Principles of Membrane Technology*. Second ed. Netherlands: Kluwer Academic Publishers.
- Mullen, G. & Durden, L., 2009. *Medical and Veterinary Entomology. (Second ed.)*. Amsterdam: Academic Press.
- Murthy, P. S. & Naidu, M. M., 2012. Sustainable management of coffee industry by-products and value addition—A review. *Resources, Conservation and Recycling*, Volume 66, pp. 45-58.
- Nigsch, J., Graf, U. & Wurgler, F. E., 1977. Caffeine toxicity in *Drosophila* strains having different mms sensitivities. *Mutation Research*, Volume 43, pp. 57-64.
- NIH, 1993. *Toxnet - Toxicology Data Network*. [Online] Available at: <http://chem.sis.nlm.nih.gov/chemidplus/rn/58-08-2>
- Nkondjock, A., 2009. Coffee consumption and the risk of cancer: An overview. *Cancer Letters*, 277(2), p. 121–125.
- Noble, R. D. & Terry, P. A., 2005. *Principles of Chemical Separation with Environmental Applications*. Cambridge: University Press.
- Opendor, K. & Dhaliwal, G. S., 2000. *PHYTOCHEMICALS BIOPESTICIDES*. Holanda: Harwood Academic Publishers.
- Orozco, A. L., Pérez, M. I., Guevara, O., Rodríguez, J., Hernández, M., González-Vila, F. J., Polvillo, O. & Arias, M. E., 2008. Biotechnological enhancement of coffee pulp residues by solid-state fermentation with *Streptomyces*. Py-GC/MS analysis. *Journal of Analytical and Applied Pyrolysis*, 81(2), p. 247–252.



- Pandey, A., Soccol, C. R., Nigam, P., Brand, D., Mohan, R. & Roussos, S., 2000. Biotechnological potential of coffee pulp and coffee husk for bioprocesses. *Biochemical Engineering Journal*, Volume 6, p. 153–162.
- Parvathy, K. S., Negi, P. S. & Srinivas, P., 2009. Antioxidant, antimutagenic and antibacterial activities of curcumin- $\beta$ -diglucoside. *Food Chemistry*, Volume 115, p. 265–271.
- Pates, H. & Curtis, C., 2005. Mosquito Behavior and vector control. *Annual Review of Entomology*, Volume 50, pp. 305-309.
- Pons, F. W. & Müller, P., 1989. Induction of frameshift mutations by caffeine in *Escherichia coli* K12. *Mutagenesis*, 5(2), pp. 173-178.
- Ramalakshmi, K., Jagan Mohan Rao, L., Takano-Ishikawa, Y. & Goto, M., 2009. Bioactivities of low-grade green coffee and spent coffee in different in vitro model systems. *Food Chemistry*, 115(1), p. 79–85.
- Ramirez-Coronel, M. A., Marnet, N., Kolli, K. V., Roussos, S., Guyot, S. & Augur, C., 2004. Characterization and Estimation of Proanthocyanidins and Other Phenolics in Coffee Pulp (*Coffea arabica*) by Thiolytic–High-Performance Liquid Chromatography. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 52(5), p. 1344–1349.
- Ramírez, J., 1988. Phenolic compounds in Coffee pulp: Quantitative determination by HPLC. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, Volume 43, pp. 135-144.
- Ramirez, J. L., Garver, L. S. & Dimopoulos, G., 2009. Challenges and approaches for mosquito targeted malaria control. *Current Molecular Medicine*, 9(2), pp. 116-30.
- Ramirez-Martinez, J. R., 1988. Phenolic compounds in coffee pulp: Quantitative determination by HPLC. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 43(2), p. 135–144.
- RBM/WHO, R. B. M., 2008. *The Global Malaria Action Plan*, Geneva: World Health Organization.
- Richard, O. W. & Davies, R. G., 1977. Imm's General Textbook of Entomology - Classification and Biology. 10th Edition. Em: New York: Chapman & Hall.

- Rocha, D., 2013. *Plantas medicinais tropicais e mediterrânicas com propriedades biocidas no controlo de insetos vetores de agentes patogénicos. Tese de Doutoramento*. Lisboa: Instituto de Higiene e Medicina Tropical, Universidade Nova de Lisboa.
- Satho, T., Dieng, H., Ahmad, M. H., Ellias, S. B., Hassan, A. A., Abang, F., Ghani, I. A., Miake, F., Ahemad, H., Fukumitsu, Y., Zuhara, W. F., Maji, A. H. A. & Kassim, N. F., 2015. Coffee and its waste repel gravid *Aedes albopictus* females and inhibit the development of their embryos. *Parasites & Vectors*, Volume 8, p. 272.
- Service, M., 1980. *A Guide to Medical Entomology*. London: The Macmillan .
- Service, M., 1986. *Lecture Notes on Medical Entomology*. Liverpool: Blackwell Scientific Publications.
- Service, M., 2008. *Medical entomology for students*. Fourth ed. Cambridge: Cambridge University Press.
- Shaalán, E. A., Canyon, D., Younes, M. W., Abdel-Wahab, H. & Mansour, H. A. , 2005. A review of botanical phytochemicals with mosquitocidal potential. *Environment Int*, 31(8), pp. 1149-1166.
- Silva , F. A., Borges, F., Guimarães, C., Lima, J. L., Matos, C. & Reis, S., 2000. Phenolic Acids and Derivatives: Studies on the Relationship among Structure, Radical Scavenging Activity, and Physicochemical Parameters. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 48(6), p. 2122–2126.
- Singleton , V. L. & Rossi Jr, J. A., 1965. Colorimetry of Total Phenolics with Phosphomolybdic-Phosphotungstic Acid Reagents. *American Journal of Enology and Viticulture*, 16(3), pp. 144-158.
- Sinka, M., Bangs, M., Manguin, S., Coetzee, M., Mbogo, C., Hemingway, J., Patil, A., Temperley, W., Gething, P., Kabaria, C., Okara, R., Boeckel, T., Godfray, C., Harback, R. & Hay, S. , 2010. The dominant *Anopheles* vectors of human malaria in Africa, Europe and the Middle East: occurrence data, distribution maps and bionomic précis. *Parasites & Vectors*, Volume 3, p. 117.
- Sirkar, K. K., 1997. Membrane separation technologies: current developments. *Chemical Engineering Communications*, 157(1), pp. 145-184.

- Sterlitech Corporation, 2015. *Sepa CF Systems Principles of Operation*. [Online] Available at: <http://www.sterlitech.com/membrane-process-development/cross-and-tangential-flow-test-cells/sepa-cf-cell.html> [Acedido em 19 08 2015].
- Sukumar, K., Perich, M. J. & Boobar, L. R., 1991. Botanical Derivates in Mosquito Control: A Reveiw. *Journal of the American Mosquito Control Association*., 7(2), pp. 210-237.
- Tabanca, N., Demirci, B., Kiyan, H. T., Ali, A., Bernier, U. R., Wedge, D. E., Khan, I. A. & Baser, K. H., 2012. Repellent and larvicidal activity of Ruta graveolens essential oils and its major individual constituents against Aedes aegypti. *Plant Medicinal*, pp. 78-90.
- TDR/WHO, 2002. Training in Tropical Disease. *Malaria Fact Sheet*.
- Teixeira, A. R., Santos, J. L. & Crespo, J. G., 2009. Sustainable membrane-based process for valorisation of cork boiling wastewaters. *Separation and Purification Technology*, Volume 66, pp. 35-44.
- Tiwari, S., Ghosh, S. K., Ojha, V. P., Dash , A. P., & Raghavendra, K., 2010. Reduced susceptibility to selected synthetic pyrethroids in urban malaria vector Anopheles stephensi: a case study in Mangalore city, South India. *Malaria Journal*, Volume 9, p. 179.
- Ulloa Rojas, J. B., Verreth , J. A., van Weerd, J. H. & Huisman, E. A., 2002. Effect of different chemical treatments on nutritional and antinutritional properties of coffee pulp. *Animal Feed Science and Technology*, 99(1-4), pp. 195-204.
- van Dam, R. M. & Feskens , E. J., 2002. Coffee consumption and risk of type 2 diabetes mellitus. *The Lancet*, 360(9344), p. 1477–1478.
- van den Berg, H., 2009. Global status of DDT and its alternatives for use in vector control to prevent disease. *Environmental Health Perspectives*, 117(11), p. 1656–1663.
- Vatandoost, H., Mashayekhi, M., Abaie, M. R., Aflatoonian, M. R., Hanafi-Bojd, A. A. & Sharif, I., 2005. Monitoring of insecticides resistance in main malaria vectors in a malarious area of Kahnooj district, Kerman province, southeastern Iran. *Journal of Vector Borne Diseases*, Volume 42, p. 100–108.

- War, A. R., Paulraj, M. G., Ahmad, T., Buhroo, A. A., Hussain, B., Ignacimuthu, S. & Sharma, H. C., 2012. Mechanisms of plant defense against insect herbivores. *Plant Signal Behavoiur*, 7(10), p. 1306–1320.
- Wermelinger, E. D. & Ferreira, A. P., 2013. Métodos de controle de insetos vetores: um estudo das classificações. *Revista Pan-Amazônica de Saúde*, 4(3), pp. 49-54.
- WHO, 1992. Vector resistance to insecticides. 15th Report of WHO Expert Committee on Vector Biology and Control. *World Health Organization Technical Report Series*, Volume 818, pp. 1-62.
- WHO, 2004. Global strategic framework for integrated vector management. *Geneva: World Health Organization*, p. 10.
- WHO, 2005. Guidelines for Laboratory and Field Testing of Mosquito larvicides, *Geneva: World Health Organization*.
- WHO, 2014. *World Malaria Report 2014*. [Online] Available at: [http://www.who.int/malaria/publications/world\\_malaria\\_report\\_2014/en/](http://www.who.int/malaria/publications/world_malaria_report_2014/en/) [Acedido em 2 Setembro 2015].
- Zaim, M. & Guillet, P., 2002. Alternative insecticides: an urgent need. *TRENDS in Parasitology*, 18(4), p. 161–163.
- Zimmering, S., Kofkoff, R. & Osgood, C., 1977. Survival of caffeine-feed adult males and females from strains of *Drosophila melanogaster*. *Mutation Research*, Volume 43, pp. 453-456.
- Zulueta, J., Ramsdale, C. & Coluzzi, M., 1975. Receptivity to malaria in Europe. *Bull World Health Organization*, 52(1), p. 109–111.